

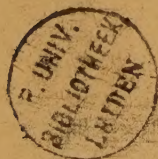
Aus dem Botanischen Institut
der Universität Marburg a. d. Lahn

Zur Physiologie
der Acridinorange-Wirkung
Untersuchungen an Hefezellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Philosophischen Fakultät
der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Ulrich Elste
aus Calbe a. d. Saale

Marburg a. d. Lahn
(D4) 1954



Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Als Dissertation angenommen am 19. 10. 1954

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. Bogen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 12. 1954

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Sonderdruck aus „Planta“, Band 45, Heft 4, Seite 325—375 (1955)

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg

I. Einleitung.

Mit dem fluorescierenden Farbstoff Acridinorange, dessen Einführung wir BUKATSCH und HAITINGER (1940) und STRUGGER (1940; 1949 siehe dort weitere Literatur) verdanken, gelingt es, Zellen von Bakterien, niederen und höheren Pflanzen rot oder grün zu fluorochromieren. STRUGGER glaubte, daß die Grünfluoreszenz auf lebende Zellen beschränkt sei, während Rotfluoreszenz den Zelltod anzeige. Demgegenüber konnte BOGEN (1953) an Hefezellen zeigen, daß über die Fluoreszenzfarbe nicht so sehr der Lebenszustand entscheidet als vielmehr die Suspensionsdichte und andere physikalische Faktoren. Das heißt also, daß bei hoher Suspensionsdichte auch tote Hefezellen nur grün fluorochromiert werden, bei geringer Suspensionsdichte hingegen lebende Zellen rot fluorescieren. Über diese Feststellung hinaus, nach der sich die Verwendung der Acridinorange-Methode als Test für den Lebenszustand der Hefezellen (STRUGGER) künftig verbietet, konnten zwei weitere Faktoren erfaßt werden: 1. Der physiologische Zustand der lebenden Zellen kann das Färbeergebnis erheblich modifizieren (BOGEN 1953) und 2. das Acridinorange ist kein unschädlicher Farbstoff, sondern vermag Hefezellen in kürzester Zeit abzutöten, bei gleichzeitigem Abbau eines großen Teiles der Zellproteine (BOGEN und KESER 1954). Damit verändert auch das Fluorochrom selbst den physiologischen Zustand und die Färbemöglichkeiten.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Veränderung des physiologischen Zustandes von Hefezellen weiter zu untersuchen, inwiefern dieser das Färbeergebnis und zugleich die Angriffsmöglichkeiten des Zellgiftes modifiziert.

In ihrem ersten Teil wird versucht, den physiologischen Zustand der Zellen durch Variation der äußeren Bedingungen (verschiedene Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit, Belüftung, Zusatz von Stoffwechselgiften u. a.) bei Bäckerhefe und einer daraus isolierten Reinhefe zu verändern und den Einfluß dieser Änderung auf die Anfärbung zu

kontrollieren. Die Ergebnisse werden den unter gleichen Bedingungen gewonnenen Resultaten über die Beeinflussung des Wachstums durch Acridinorange gegenübergestellt. Im zweiten Teil der Arbeit soll die Wirkung des Farbstoffes auf den Stoffwechsel der Hefen durch Messung des Proteinabbaus und des Gasaustausches einer Analyse unterzogen werden.

Wie bereits oben angeführt wurde, greifen die Untersuchungen über die physiologischen Bedingungen für die Anfärbung und die durch den Farbstoff hervorgerufenen Änderungen des physiologischen Zustandes der Zellen ineinander. Dabei nehmen die Wachstumsversuche eine Mittelstellung ein, da sie nicht allein der Analyse der Anfärbung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen dienen, sondern auch die Beeinflussung dieses Wachstums durch Acridinorange anzeigen. Insofern lassen sich die Ergebnisse nicht scharf in die beiden oben angeführten Versuchsgruppen trennen, wie es hier aus Gründen der besseren Übersicht versucht wird.

II. Experimenteller Teil.

A. Methodisches.

1. Versuchsmaterial.

a) *Bäckerhefe* wurde jeweils frisch vom Lieferanten bezogen und im Eisschrank bei $+20^{\circ}\text{C}$ gelagert. Sie wurde in einer feuchten Petri-Schale höchstens eine Woche lang aufbewahrt; Unterschiede in der Lagerungsdauer waren innerhalb dieses Zeitraumes ohne Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

b) *Reinhefe*. Aus dieser Bäckerhefe wurde durch sterile Ausspätung einer Kulturprobe (s. unten) auf Nähragar eine Reinkultur hergestellt. Sie erwies sich bei mikroskopischer Kontrolle als frei von Bakterien und anderen Hefen.

2. Suspensionsflüssigkeiten.

a) *Destilliertes Wasser*. Verwendet wurde immer doppelt destilliertes Wasser, davon einmal über Quarz.

b) *Leitungswasser*. Marburger Leitungswasser wurde abgekocht und über Nacht stehen gelassen.

c) *Glucoselösung*. 1% Glucose in Leitungswasser.

d) *Nährlösung nach SCHOPFER*. 0,5 g MgSO_4 , 1,5 g KH_2PO_4 , 1 g Asparagin und 50 g Glucose auf 1000 ml doppelt destilliertes Wasser.

e) *Unvollständige Nährlösung*. 1—3 Bestandteile der Nährlösung nach SCHOPFER wurden wechselweise weggelassen.

f) *Nährlösung mit verschiedenen N-haltigen Nährstoffen* enthielt N in gleichem molaren Verhältnis als Asparagin (1 0 / $_{00}$), Ammoniumsulfat (0,9 0 / $_{00}$), Kaliumnitrat (1,35 0 / $_{00}$) oder Harnstoff (0,4 0 / $_{00}$). Die übrigen Bestandteile sind die gleichen wie in der Nährlösung nach SCHOPFER.

g) *Agarplatten* enthielten Nährlösung nach SCHOPFER + 2% Agar, s. S. 328.)

3. Verwendete Substanzen.

Acridinorange „für Mikroskopie und Bakteriologie“ (Merck) (s. S. 337).

Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, p. a.).

Asparagin (Merck, ohne Angabe des Reinheitsgrades).

Glucose (Dextropur, handelsüblich).

Harnstoff (Merck, kristallisiert, reinst).

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (Merck, p. a.).

Magnesiumsulfat, MgSO_4 (Merck, p. a.).

Natriumazid, NaN_3 (Merck, ohne Angabe des Reinheitsgrades).

4. Suspensionen.

a) *Bäckerhefe.* Zur Herstellung einer Hefesuspension wurde Bäckerhefe nach der Aufbewahrung im Eisschrank abgewogen und in dem jeweils angegebenen Suspensionsmittel durch Schütteln verteilt. Die Suspensionsdichte (S.D.) wird angegeben als g Hefe/x ml Suspensionsmittel: z. B. 1:200 = 1 g Hefe in 200 ml Suspensionsmittel.

b) *Reinhefe.* Eine Probe der Reinhefe wurde in Nährlösung nach SCHOPFER übergeimpft und 4 Tage lang unter Belüftung zu einer Kultur herangezogen. Dann wurde die Hefe von der Nährlösung abzentrifugiert, mehrfach mit Aq. dest. ausgewaschen, in destilliertem Wasser suspendiert und erneut unter Belüftung 24 Std lang stehengelassen, d. h. bis zur vollständigen Veratmung der noch vorhandenen Glucose. Anschließend wurde wieder zentrifugiert, die Hefe mehrfach mit Aq. dest. ausgewaschen, eine Stammsuspension in destilliertem Wasser hergestellt und deren Suspensionsdichte durch Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt. Die Aufschwemmung wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Für Versuchszwecke wurde diese Suspension soweit mit dem entsprechenden Suspensionsmittel verdünnt, bis die durch Auszählen ermittelte Zellzahl je Kubikmillimeter derjenigen einer Aufschwemmung aus Bäckerhefe mit der gleichen S.D. entsprach, z. B. bei 1:200 = $5,2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³.

c) *Behandlung der Suspensionen.* Ruhende Suspensionen wurden in einem (mit Wattestopfen verschlossenen) Erlenmeyer-Kolben bei 25°C im Luftthermostaten aufbewahrt. Bei unbewegten, belüfteten Suspensionen wurde ein lebhafter Strom wattegefilterter Luft durch die Flüssigkeit geleitet. Die Raumtemperatur betrug 15–20°C. Bei Schüttelversuchen wurden die Kolben in eine Anzuchtanlage (nach PIRSON, TICHY und WILHELM 1952) eingesetzt und ohne Belüftung mit einer Frequenz von etwa 100/min und einer Amplitude von 10 cm horizontal bewegt. Die Temperatur betrug 25°C.

5. Fluorochrom.

Acridinorange (AO). 0,1 g AO wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und diese Standardlösung jeweils im Verhältnis 1:10 mit der betreffenden Hefesuspension vermischt. Die Versuchskonzentration betrug immer 0,01 % AO (= „1:10000“). Die Stammlösung wurde mindestens einmal wöchentlich erneuert und im Dunkeln aufbewahrt. Der p_H-Wert der Lösung (p_H 3,8) blieb innerhalb der Aufbewahrungszeit unverändert. Das vorliegende AO ist das Chlorzinkdoppelsalz des Farbstoffes und enthält BaCl₂ als sog. Stellsalz. Aus einer Elementaranalyse wurde folgende Zusammensetzung berechnet:

Acridinorange	29,8 %
ZnCl ₂	15,3 %
BaCl ₂	54,9 %

Der Acridinstickstoff wurde bei der Mikro-Kjeldahl-Methode vollständig erfaßt (BOGEN und KESER 1954).

6. Die Kontrolle der Fluoreszenz

erfolgte mit dem Zeiss-Winkel-Standardmikroskop entweder mit einer Bogenlampe als Lichtquelle oder mit dem Hg-Höchstdruckbrenner der Fa. Zeiss-Winkel, Blaufilter BG 1,2 mm dick (Schott u. Gen.), Okularsperrfilter Orangefilter OG 1 bzw. OG 4 (Schott u. Gen.). Zur Erzielung reproduzierbarer Auszählungsergebnisse wurden bei jeder Messung in den ersten Versuchen 10 Gesichtsfelder von 3 verschiedenen Präparaten jeder Probe, später, wenn immer es die zum Auszählen zur Verfügung stehende Zeit erlaubte, 21 Gesichtsfelder von 7 Präparaten jeder Probe

ausgezählt. Jedes Gesichtsfeld sollte 100—150 Zellen enthalten. Die Dauer der Messung betrug durchschnittlich 10—15 bzw. 25—30 min, d. h. 1—1,5 min für jedes Gesichtsfeld. Auf diese Weise konnte eine Schädigung durch Blaulicht gering gehalten werden.

7. Die Messung der Suspensionsdichte

erfolgte in der von BOGEN (1953) beschriebenen Weise.

8. Plattenversuche

dienten zur Bestimmung der Überlebensrate. Unter möglichst sterilen Bedingungen wurde eine Probe (0,5—1 ml) der Versuchslösung mit Aq. dest. soweit verdünnt, bis die S.D. $4 \cdot 10^3$ Zellen/mm³ betrug (d. h. durchschnittlich 16 Zellen je Großquadrat der THOMA-Zählkammer). Diese Probe wurde in 4 Stufen (1:10, 1:10, 1:10 und 1:2) mit destilliertem Wasser weiter verdünnt, unter längerem kräftigen Schütteln im Reagenzglas. Die Endkonzentration betrug dann 2 Zellen je Kubikmillimeter. Davon wurde jeweils 0,1 ml auf Nähragar ausgespatelt. So waren auf jeder Petri-Schale (10 cm $\varnothing$) rund 200 Kolonien zu erwarten. Die Platten wurden 3—5 Tage lang bei 25° C im Luftthermostaten bebrütet, die gebildeten Kolonien anschließend unter einem binokularen Präpariermikroskop ausgezählt. Es wurden 10—12 Petri-Schalen parallel beimpft und jeder Versuch mindestens 6mal wiederholt.

Verunreinigungen durch andere Pilze und Bakterien, die schon in der Versuchslösung enthalten sein können, sind nicht auszuschließen. Indessen wachsen die (an das Nährmedium adaptierten) Reinhefen schneller als andere Pilze und, infolge des p_H-Wertes des Nährbodens (p_H 4,5), auch schneller als die meisten Bakterien. Ein rechtzeitiges Auszählen wird also von Verunreinigungen dieser Art nicht beeinträchtigt.

9. Die Bestimmung der Farbstoffmenge

in der Suspensionsflüssigkeit nach dem Abzentrifugieren der Hefe (sog. „Restfarbstoff“) geschah mit dem Photometer nach PULFRICH. Aus den gemessenen Extinktionswerten wurde die Farbstoffmenge mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Die verwendeten Spektralfilter waren für AO in Wasser S 47 und für AO in 70%igem Alkohol S 50.

10. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration

erfolgte mit der Chinhydronelektrode und dem Ionometer nach LAUTENSCHLÄGER.

11. Quantitative Stickstoffbestimmungen

nach KJELDAHL (vgl. BOGEN und KESER 1954) mit der Destillationsapparatur der Fa. Keiner, Hamburg: 0,2 g Bäckerhefe wurde in 40 ml (S.D. 1:200) oder 100 ml (1:500) Suspensionsmittel verteilt. Nach der jeweils angegebenen Zeit wurde zentrifugiert (30 min bei 5000 U/min), die Suspensionsflüssigkeit vorsichtig eingedunstet, die abzentrifugierte Hefe 24 Std bei 80° getrocknet, ihr Trockengewicht bestimmt und sie anschließend mit Seesand verrieben, bis bei der mikroskopischen Kontrolle keine intakten Zellwände mehr zu erkennen waren. Die zerkleinerte Hefe wurde mit 25 ml 70%igem Alkohol unter häufigem Umschütteln 24 Std lang bei Zimmertemperatur extrahiert. Danach wurde wieder zentrifugiert (30 min bei 5000 U/min) und aus der überstehenden Lösung der Alkohol vertrieben. Der N-Gehalt aller 3 Fraktionen wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt

(Veraschung und Destillation wurden nach dem Verfahren von KLINGMÜLLER 1952, Titration nach der Borsäuremethode ausgeführt). Die N-Mengen lagen zwischen 0,02 und 0,3 mg. Vor dem Eindunsten der Suspensionsflüssigkeit und des Alkoholauszuges wurde der Farbstoffgehalt in beiden photometrisch gemessen.

12. Manometrische Gaswechselbestimmungen

dienten zur Ermittlung des von der Hefe im Laufe des Versuches aufgenommenen O_2 bzw. abgegebenen CO_2 . Zur Anwendung kam die $\pm$ KOH-Methode (UMBREIT, BURRIS und STAUFFER 1947, DIXON 1951). Gearbeitet wurde mit 3 Parallelen. Das Volumen der Gefäße betrug 29,55–30,95 ml. Die Gefäße wurden bei 25° C mit einer Frequenz von 100/min und einer Amplitude von 4–5 cm horizontal geschüttelt. Abgelesen wurde nach 15, 20 oder 30 min. Die Ausschläge der Manometer betrugen durchschnittlich 30 mm.

Um Ausschläge gleicher Größenordnung zu erhalten, mußte bei den verschiedenen Suspensionsdichten mit verschiedenen Mengen an Suspensionsflüssigkeiten gearbeitet werden. Die Gefäße wurden beschickt bei 1:200 mit 2,7 ml einer Suspension von 0,5 g Hefe in 90 ml 1%iger Glucoselösung, bei 1:500 mit 5,7 ml einer Suspension von 0,2 g Hefe in 95 ml 1%iger Glucoselösung.

Die Ansätze enthielten dementsprechend bei
1:200 0,3 ml einer 0,1%igen AO-Lösung bzw. 0,3 ml NaN_3 -Lösung (10^{-2} mol),
1:500 0,3 ml einer 0,2%igen AO-Lösung

und bei den Kontrollen beider Suspensionsdichten 0,3 ml Aq. dest. Die zur Ermittlung der O_2 -Aufnahme bestimmten Gefäße enthielten zusätzlich 0,3 ml 20%ige KOH. Nach dem Einsetzen der Gefäße in den Thermostaten wurden sie 50 min lang geschüttelt, bis die Ausschläge der Manometer bei allen Gefäßen konstant waren, und dann deren Inhalt mit den im Ansatz befindlichen Zusätzen vermischt.

Da die Versuche unter den gleichen Bedingungen wie bei den anderen Versuchsgruppen durchgeführt werden sollten, konnte nicht in gepufferten Lösungen gearbeitet werden, zumal bei einem Kontrollversuch mit $\frac{1}{20}$ mol KH_2PO_4 -Lösung als Puffer wesentlich andere Ergebnisse erhalten wurden, als ohne Anwendung eines Puffers.

Die Anwendung ungepufferten Suspensionsflüssigkeiten ist insofern berechtigt, als die p_H -Änderungen in den Versuchslösungen mit AO und in den Kontrollen ohne AO innerhalb der Versuchszeit gleich waren (von 6,3 auf 5,3 bei 1:500 und von 6,3 auf 4,8 bei 1:200).

Nach jedem Versuch wurde nach dem Abzentrifugieren der Hefe der p_H -Wert und der Farbstoffgehalt der Versuchslösung gemessen.

13. Statistik.

Die statistische Auswertung der Versuche über die Anfärbung und das Wachstum wurde mit Hilfe eines von GEBELEIN und HEITE (1951) angegebenen Schemas vorgenommen.

Ermittelt wurden der Mittelwert und die Standardstreuung als mittlere quadratische Abweichung des Mittelwertes. Die relative Streuung lag zwischen $\pm 2,6$ und 12,9%, in der Regel bei $\pm 5,2\%$. Die höheren Werte finden sich vor allem beim Auftreten sog. „Oberflächenhefen“, da sich diese Hefen schlecht durch Schütteln in der Flüssigkeit verteilen lassen.

14. Abkürzungen.

AO = Acridinorange.	S.D. = Suspensionsdichte.
Aq. dest. = doppelt destilliertes Wasser.	Std = Stunden.

B. Versuchsergebnisse.

Die von BOGEN (1953) beschriebenen Versuche hatten bei gleicher Farbstoffkonzentration eine Anfärbung der Hefezellen in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte ergeben: Bei hoher S.D. ($3,2 \cdot 10^5$ Zellen/mm³ und mehr) konnte auch nach 24stündiger Anfärbung keine wesentliche Erhöhung des zu Versuchsbeginn vorhandenen Prozentsatzes rotfluorochromierter Zellen mehr erzielt werden, während bei geringer S.D. ($2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³ und weniger) nach 8 Std bereits 100 % der Zellen rot fluorescierten.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Interesse hauptsächlich auf den „kritischen Bereich“ zwischen $1,3 \cdot 10^4$ Zellen/mm³ (S.D. 1:800) und $2,1 \cdot 10^5$ Zellen/mm³ (S.D. 1:50) gerichtet und die meisten Untersuchungen bei der mittleren S.D. 1:200 (= $5,2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³) ausgeführt.

1. Die Kontrolle der Anfärbung.

a) Die Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser. α) Eine Hefesuspension wurde im Verhältnis 1:200 in Leitungswasser mit AO 1:10000 angesetzt und die Fluoreszenz der Zellen nach 10 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 24 Std festgestellt.

Bereits STRUGGER (1944) unterschied zwischen verschiedener Anfärbung von Zellmembran, Cytoplasma, Vacuole, Kern, Chromosomenäquivalenten und cytologisch nicht genau bestimmbaren Einschlüssen. Da die in jener Arbeit herausgestellte Unterscheidung von toten und lebenden Zellen im wesentlichen nur von der Fluorochromierbarkeit des *Plasmas* abhängen sollte, untersuchte BOGEN (1953) nur die rote und grüne Plasmafärbung. Um eine weitergehende Differenzierung zu ermöglichen, wurde hier zwischen 3 Zellgruppen unterschieden:

1. Zellen mit grüner Plasmafluoreszenz, der gesamte Protoplast fluoresciert dunkel- bis gelbgrün.

2. Zellen mit grüner Fluoreszenz des „Grundplasmas“ und gelb- bis rotfluoreszierenden Einschlüssen.

3. Zellen mit gelber bis roter Plasmafluoreszenz. Dabei können in dem so gefärbten Plasma noch intensiver fluoreszierende Einschlüsse vorhanden sein (s. unten).

Für Versuchszwecke erscheint diese Einstellung ausreichend. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß innerhalb einer Gruppe unter verschiedenen Versuchsbedingungen auch sehr unterschiedliche Anfärbungen erfaßt werden können, soweit es die Qualität und Intensität der Farbe betrifft.

Die Anfärbung in Leitungswasser vollzieht sich, in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen, in der Regel nach folgenden Stufen:

1. Grün- bis Rotfärbung der Membran. Sie ist meist nur unmittelbar nach Versuchsbeginn erkennbar und kann teilweise überhaupt ausbleiben; sie wurde daher bei den quantitativen Messungen vernachlässigt.

2. Grünfärbung des Plasmas und Rückgang der Membranfärbung.

3. Gleichzeitig oder wenig später treten gelbe bis rote Einschlüsse im grün fluoreszierenden Plasma auf, deren Färbung sich unter Umständen im Laufe der

Zeit vertieft. Die Einschlüsse sind an Gestalt, Farbe und Anzahl nicht gleichwertig. Auch Vacuolen können gefärbt sein. Über die Natur der Einschlüsse können keine sicheren Aufschlüsse gegeben werden. Einmal ist über die Cytologie der Hefezellen noch zu wenig Gesichertes bekannt, als daß eine eindeutige Differenzierung von Zellkern, Mitochondrien, Mikrosomen und möglicherweise noch anderen Körpern vorgenommen werden könnte; andererseits reichen die Beobachtungszeit und die für die Fluoreszenzmikroskopie zur Verfügung stehenden Hilfsmittel zur Zeit noch nicht aus, um bei der Kleinheit der Hefezelle zu der für eine statistische Auswertung notwendigen Anzahl von Meßergebnissen zu kommen. Bei Verwendung einer Ölimmersion ist einmal das Gesichtsfeld so klein, daß nur wenige Hefezellen zur gleichen Zeit beobachtet werden können; zum anderen muß die Intensität der Beleuchtungsquelle so stark sein, daß schon in kurzer Zeit Lichtschädigungen auf-

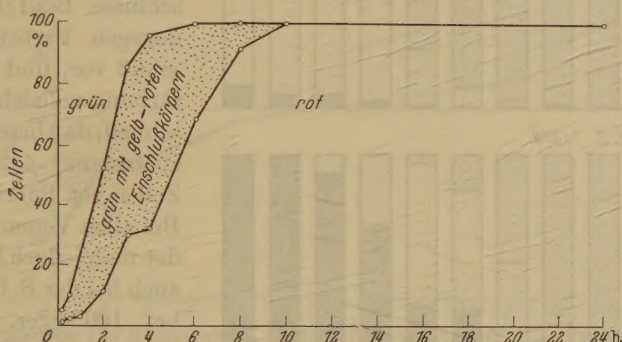


Abb. 1. Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz roter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Der punktierte Bereich zwischen beiden Kurven gibt den Anteil der grünen Zellen mit Einschlusskörpern wieder.

treten, wie z. B. die Auflösung von Einschlusskörpern und damit verbunden eine intensivere Plasmafärbung u. ä.

4. Das Plasma färbt sich gelbgrün bis orange. Die Einschlüsse sind dann nicht mehr differenzierbar.

5. Das Plasma ist feuer- bis dunkelrot fluorochromiert und „destruiert“.

In Abb. 1 erkennt man das prozentuale Verhältnis der 3 Anfärbungsgruppen und den Anstieg der Rotfluoreszenz bzw. die Abnahme der Grünfluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit, d. h. von der Einwirkungs-dauer des Farbstoffes. 10 min nach Versuchsbeginn stellt man etwa 95 % grüner Zellen, ferner 4 % Zellen mit gelbroten Einschlüssen und 1 % roter Zellen fest. Später nimmt die Zahl der Zellen mit Einschlüssen schnell zu, die der rotfluorochromierten langsamer. In der graphischen Darstellung ergeben sich 2 „Sättigungskurven“, die zeitlich gegeneinander verschoben sind.

Der Versuch zeigt, daß bei einer Suspension von Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:200, mit AO alle Zellen rotfluorochromierbar sind, und daß der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen von der Einwirkungs-dauer des Farbstoffes abhängig ist.

β) In gleicher Weise wurde auf die Anfärbung der Zellen in 3 verschiedenen S.D. geprüft (1:50, 1:200 und 1:800). Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

Bei 1:50 herrscht Farbstoffmangel; nach 24 Std sind daher höchstens 10 % der Zellen rot fluorochromiert. Dieser Prozentsatz erhöht sich auch

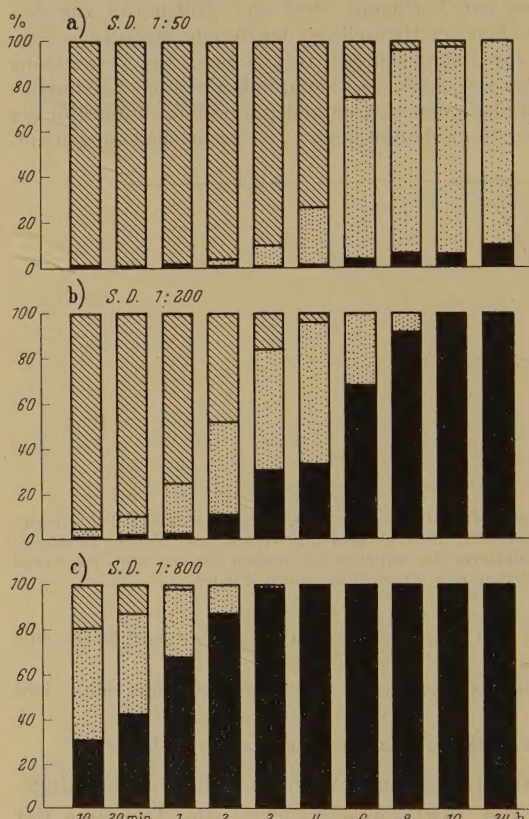


Abb. 2 a—c. Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:50 (a), 1:200 (b) und 1:800 (c). Erklärungen siehe Abb. 6.

nach weiteren 24 Std nicht mehr. — 8—10 Std nach Versuchsbeginn haben fast alle übrigen Zellen gelbe bis rote Einschlüsse. Bei 1:800 liegt dagegen Farbstoffüberschuß vor, und die Anfärbung vollzieht sich so schnell, daß bereits nach spätestens 4 Std alle Zellen rot fluorescieren. Bei allen Versuchen findet man jedoch hier, wie auch bei der S.D. 1:200, bei 100%iger Rotfärbung gelegentlich eine oder wenige grüne Zellen.

Die Ergebnisse stimmen mit den Befunden BOGENS (1953) überein, wonach praktisch alle Zellen rot fluorochromierbar sind, und daß bei gegebener Farbstoffkonzentration die Anfärbung von der Suspensionsdichte und der Anfärbungszeit abhängt.

b) Die Anfärbung von Bäckerhefe in destilliertem Wasser. Da BOGEN (1953) als Suspensionsmittel Aq.dest. verwendet hatte, sollte nunmehr das Färbeverhalten der Bäckerhefe in destilliertem Wasser untersucht werden.

Bäckerhefe wurde 1:200 in Aq.dest. suspendiert, mit AO gefärbt und die Fluoreszenz nach 30 min, 2, 4, 6, 8, 24 und 48 Std kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 eingetragen.

Der Prozentsatz roter Zellen ist zu Anfang wesentlich höher als in Leitungswasser, nach $\frac{1}{2}$ Std beträgt er 27 % anstatt 1—2 %. Nach

6 Std ist er aber bereits *geringer* und erreicht innerhalb von 24 Std nur 70—75%. Diese Zahl bleibt auch nach 48stündiger Anfärbung erhalten. 100%ige Rotfärbung findet im Gegensatz zum Leitungswasser nicht statt. Die nicht rot fluorescierenden Zellen sind grün gefärbt. Auffällig ist ferner, daß nur wenige Zellen mit gelbroten Einschlüssen auftreten und zwar nur zu Beginn des Versuches.

Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden BOGENS, der bei der gleichen Hefekonzentration nach 48 Std 75% rotfluorochromierbarer Zellen fand. Es zeigt weiterhin, daß die An-

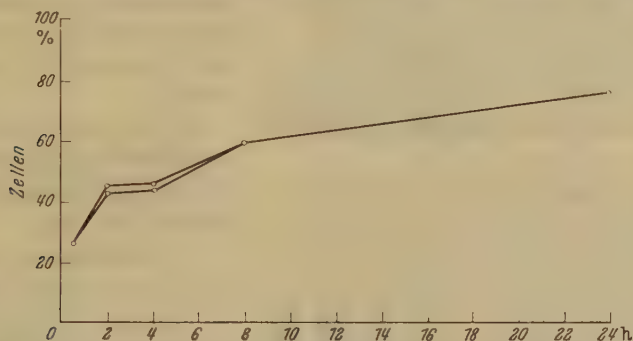


Abb. 3. Anfärbung von Bäckerhefe in Aq. dest. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz roter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

färbung (außer von der Einwirkungs*dauer* des Farbstoffes und von der Suspensions*dichte*) auch vom Suspensions*mittel* abhängt.

c) Die Anfärbung der Bäckerhefe in Glucoselösung. In den folgenden Untersuchungen wurde nunmehr versucht, den physiologischen Zustand der Hefezellen durch eine unterschiedliche Anregung des Stoffwechsels zu verändern. Zu diesem Zwecke wurde die Hefe zunächst in 1%iger Glucoselösung (Leitungswasser) suspendiert, und zwar in den gleichen Verdünnungsstufen 1:50, 1:200 und 1:800 (wie unter 1a).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 eingezeichnet.

a) Der Prozentsatz rotfluorescierenden Zellen ist in gleichem Sinne wie bei den Leitungswasserversuchen von der Suspensions*dichte* abhängig. Die Rotfluoreszenz tritt jedoch *verzögert* ein (s. Abb. 6).

b) Grüne Zellen mit gelbroten Einschlüssen sind zu Versuchsbeginn vorhanden, und zwar bei 1:800 in größerer Anzahl als bei 1:200 oder 1:50. Nach 4 Std nimmt ihre Zahl ab und nach 24 Std sind Einschlüsse meist nicht mehr erkennbar. Die Summe rotfluorescierenden Zellen und solcher mit Einschlüssen erreicht aber bei 1:200 niemals den Wert von 100%, wie bei Leitungswasser allein, sondern strebt einem bestimmten *geringeren* Wert zu, der seinerseits ebenfalls von der Suspensions*dichte*

abhängt und bei 1:200 ungefähr 40 % (roter Zellen) beträgt. Dieser Wert bleibt dann ziemlich konstant; er steigt in den nächsten 24 Std meist nur noch unerheblich an.

c) Bei den grünen Zellen macht sich bereits nach 24 Std eine *Entfärbung* bemerkbar. Diese ist nach weiteren 24 Std so weit fortgeschritten,

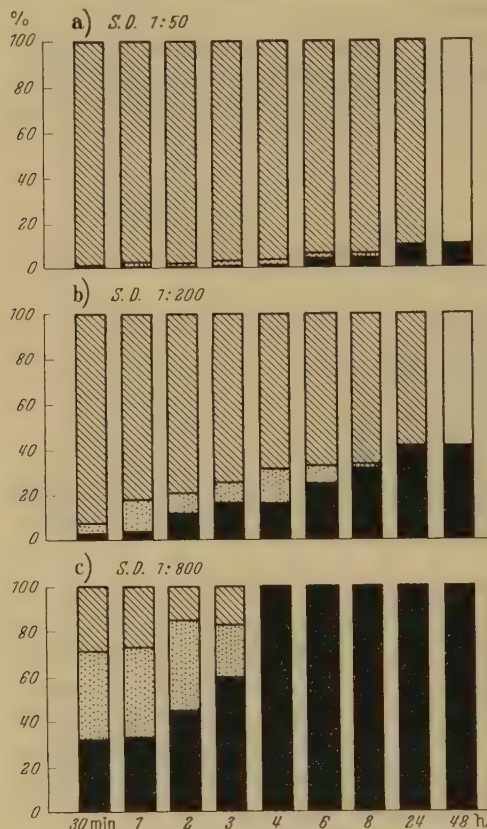


Abb. 4 a—c. Anfärbung von Bäckerhefe in Glucoselösung, S.D. 1:50 (a), 1:200 (b) und 1:800 (c). Erklärungen siehe Abb. 6.

Kohlenhydratstoffwechsel und damit den physiologischen Zustand zu verändern.

α) Durch eine Suspension von Bäckerhefe, 1:200 in Glucoselösung, wurde während der ganzen Versuchsdauer wattegefilterte Luft in kräftigem Strom hindurchgeleitet. AO-Zusatz erfolgte sofort, nach 2 und 4 Std. Als Kontrolle diente eine Suspension ohne Glucose mit sofortiger Zugabe von AO.

Abb. 5 zeigt, daß Belüftung die Rotfärbung stark beschleunigt, und zwar sowohl in Leitungswasser als auch in 1%iger Glucoselösung.

daß diese Zellen im Fluoreszenzmikroskop nicht mehr sichtbar sind, und daß daher nur noch rote Zellen ausgezählt werden können. Die Prozentsätze müssen durch Hellfeldkontrollen ermittelt werden.

Die Anwesenheit von Glucose in der Suspensionsflüssigkeit beeinflusst somit die Anfärbung wie folgt:

1. Sie verzögert die Rotfluorochromierung,
2. sie setzt die Zahl der Zellen mit angefärbten Einschlüssen herab,
3. sie verhindert eine 100%ige Rotfärbung und
4. sie führt zur Entfärbung grüner Zellen.

d) Die Anfärbung von Bäckerhefe in durchlüfteten Suspensionen. Da bei untergärigen Hefen durch aerobe Bedingungen eine Atmung (unter adaptiver Enzyymbildung) induziert werden kann (vgl. EPHRUSSI und SLO-NIMSKI 1950), ist ein weiteres Mittel gegeben, den

Aus Abb. 6 ist ferner zu ersehen, daß $\frac{1}{2}$ Std nach Versuchsbeginn der Prozentsatz roter Zellen um so höher ist, je später AO dem Versuch hinzugefügt wurde.

Der Prozentsatz der Zellen mit gefärbten Einschußkörpern steigt am Anfang des Versuches sehr stark an, geht dann aber wieder zurück und ist nach 24 Std nur noch sehr gering. Der Rückgang wird um so mehr beschleunigt, je später AO dem Versuch hinzugefügt worden ist. 30 min

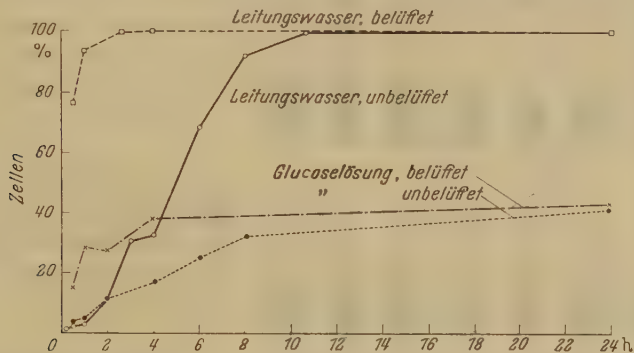


Abb. 5. Einfluß der Belüftung auf die Rotfluorochromierung von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

nach AO-Zugabe zur Versuchslösung wurden folgende Prozentzahlen ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Prozentsatz roter Zellen und grüner Zellen mit gelb-roten Einschußkörpern 30 min nach AO-Zusatz. Anfärbung von Bäckerhefe in belüfteter Glucoselösung, S.D. 1:200. AO-Zugabe zu Versuchsbeginn, nach 2 und 4 Std.

AO-Zugabe	Rotfluorochromierte Zellen %	Grüne Zellen mit gelbroten Einschlüssen %
Zu Versuchsbeginn	14,9	25,8
2 Std nach Versuchsbeginn . .	31,2	15,4
4 Std nach Versuchsbeginn . .	38,8	7,1

Zwischen roten und grünen Zellen stellt sich auch hier nach spätestens 24 Std das gleiche Zahlenverhältnis ein wie bei den unbelüfteten Versuchen, nämlich 40% rote und 60% grüne (bzw. entfärbte) Zellen (s. S. 334), d. h. es findet hier die gleiche Entfärbung der grünen Zellen statt wie bei Verwendung des gleichen Suspensionsmittels ohne Belüftung.

β) In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Suspensionsdichte variiert und Aufschwemmungen in den Verhältnissen 1:100, 1:150, 1:200, 1:300 und 1:400 hergestellt und sofort mit AO versetzt.

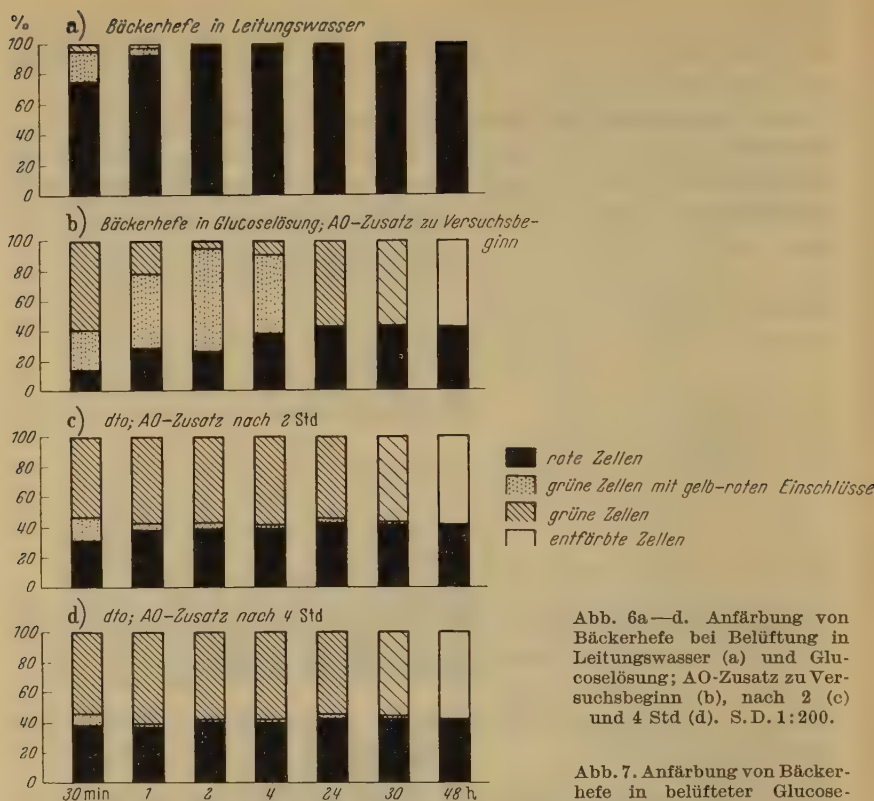
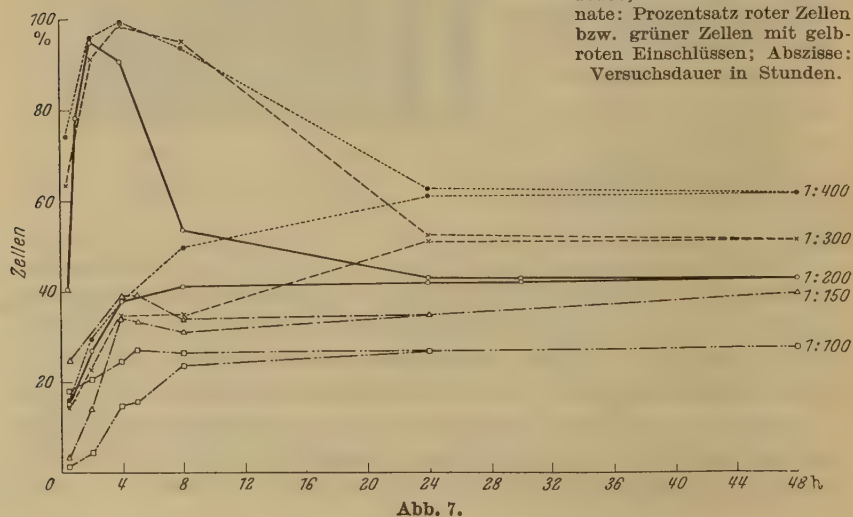


Abb. 6 a—d.

Abb. 6a—d. Anfärbung von Bäckerhefe bei Belüftung in Leitungswasser (a) und Glucoselösung; AO-Zusatz zu Versuchsbeginn (b), nach 2 (c) und 4 Std (d). S.D. 1:200.



Aus Abb. 7 ist die *Abhängigkeit der Anfärbung von der Suspensionsdichte zu ersehen*. Besonders auffällig ist die Zahl der Zellen mit Einschlüssen. Deren prozentualer Anstieg ist um so größer und der Rückgang um so mehr verzögert, je geringer die Suspensionsdichte ist.

Nach 24 Std hat sich bei allen Ansätzen wie bei den vorausgegangenen Versuchen ein Gleichgewicht von roten und grünen (bzw. entfärbten) Zellen ausgebildet. Dieses Gleichgewicht zeigt eine lineare Abhängigkeit von der S. D. (Tabelle 2).

e) Der Einfluß von Natriumazid auf die Anfärbung. In Weiterführung der Stoffwechselversuche wurde nunmehr den unbelüfteten Glucose- und Leitungswasserversuchen Natriumazid zugesetzt, um die Atmung bzw. den Phosphatstoffwechsel zu hemmen (FALES 1953).

Tabelle 2. *Abhängigkeit des Zahlenverhältnisses roter:grüner Zellen von der S.D.*

Anfärbung von Bäckerhefe in belüfteter Glucoselösung. Auszählung 48 Std nach Versuchsbeginn.

S. D.	Rote Zellen %	Grüne (bzw. entfärbte) Zellen %
1:100	28,3	71,7
1:150	39,4	60,6
1:200	42,7	57,3
1:300	50,8	49,2
1:400	60,8	39,2

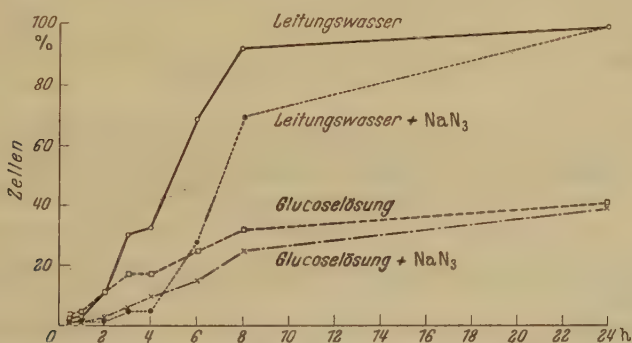


Abb. 8. Einfluß von Natriumazid auf die Rotfluorochromierung von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

Dazu wurden die 3 S. D. 1:50, 1:200 und 1:800 in Leitungswasser und 1%iger Glucoselösung mit AO und NaN₃ (10⁻³ mol) versetzt. Die Versuche wurden variiert, indem zunächst AO und NaN₃ gleichzeitig zu Versuchsbeginn zugesetzt wurden, AO zu Anfang und NaN₃ 30 min später und NaN₃ sofort und AO 30 min später.

In allen Fällen ist eine erhebliche *Verzögerung der Rotfärbung* festzustellen (hierzu Abb. 8, für die S. D. 1:200 in Leitungswasser und Glucoselösung). Zugleich ist auch die *Entfärbung der grünen Zellen in Glucoselösung nach 24 Std sichtbar verzögert*. Dagegen ist eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von AO und NaN₃ nicht zu bemerken.

Die durch Azid bewirkte *Verzögerung* der Rotfärbung ist streng zu unterscheiden von der *Verhinderung* der Rotfluorochromierbarkeit durch Glucose. Nach 24 Std werden bei Azidzusatz die gleichen Prozentsätze roter Zellen wie bei den Kontrollen in Leitungswasser (100% bei S.D. 1:200) und in Glucoselösung (40%) gefunden.

f) Der Einfluß von vollständiger Nährlösung auf die Anfärbung. Es erschien zweckmäßig, fernerhin die Anfärbung in Gegenwart einer vollständigen Nährlösung zu untersuchen, die unter normalen Bedingungen

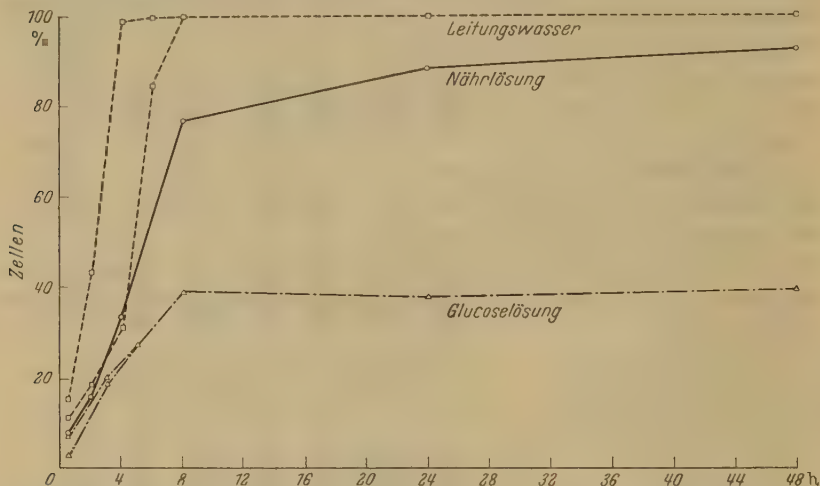


Abb. 9. Anfärbung von Bäckerhefe in Nährlösung nach SCHOPFER. Zum Vergleich sind die Anfärbekurven in Leitungswasser und Glucoselösung mit eingezeichnet. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen bzw. grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

ein gutes Wachstum der Hefe und damit auch einen intensiven *N-Umsatz* ermöglicht.

1 g Hefe wurde in 200 ml Nährlösung nach SCHOPFER suspendiert und mit AO 1:10000 angefärbt.

Zum Vergleich sind in Abb. 9 die Anfärbekurven in Leitungswasser und Glucoselösung bei gleicher S.D. eingezeichnet.

Der Prozentsatz roter Zellen ist in Nährlösung von Anfang an wesentlich höher als bei Anfärbung in Glucoselösung. Es werden keine grünen Zellen mit gelbroten Einschlüssen bemerkt. (Bei 2 Versuchen traten solche nach 2 Std auf, waren aber nach 4 Std wieder verschwunden. Dieses Verhalten konnte indessen nicht immer reproduziert werden und ist möglicherweise auf eine Lichtschädigung zurückzuführen.)

Wenn hier und im folgenden vom Fehlen der Einschlüsse gesprochen wird, so soll das nicht besagen, daß der Zellinhalt homogen rot oder grün fluoresciert. Vorhandene Einschlüsse heben sich lediglich weniger deutlich aus dem Zellinhalt heraus und entziehen sich somit bei einer schnellen Durchmusterung der Beobachtung.

Ferner muß berücksichtigt werden, daß es unter den hier geschilderten Bedingungen nicht möglich ist, beim Fehlen einer grünen Plasmafluorescenz Einschlüsse eindeutig zu identifizieren, da sie eine sehr verschiedene Größe haben können. Solche Zellen sind daher meist unter den roten Zellen aufgeführt worden.

Die *Intensität* der Anfärbung der roten und auch der grünen Zellen ist aber von der in Leitungswasser beobachteten verschieden. Bei den grünen Zellen ist sie zu Anfang schwächer als in Leitungswasser oder Glucoselösung. Später vertieft sich die Färbung, anschließend folgt eine *Entfärbung*, so daß nach 24 bzw. 48 Std keine grünen Zellen mehr auf-

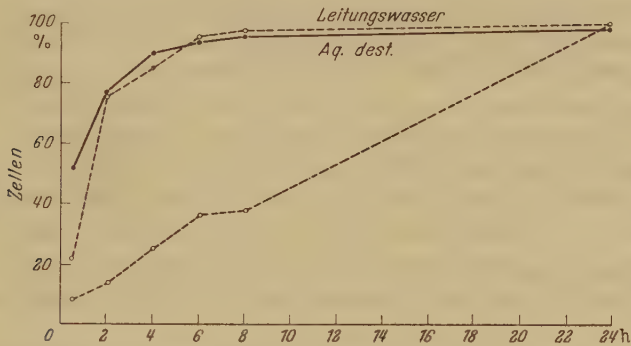


Abb. 10. Anfärbung von Reinhefe in Aq. dest. und Leitungswasser S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen bzw. grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

gefunden werden können. Eine Messung der Färbungsintensität der einzelnen Zellen ist im Fluorescenzmikroskop nicht möglich; daher können die hier erhaltenen Ergebnisse nicht mehr mit den bei den vorher durchgeführten Versuchen gewonnenen Resultaten verglichen werden.

g) **Die Anfärbung von Reinhefen.** Da Bäckerhefe meist aus einer mehr oder weniger großen Zahl verschiedener Heferasen besteht und diese untereinander möglicherweise ein verschiedenes Anfärbeverhalten zeigen können, sollten zunächst an einer Einzellkultur die wichtigsten, mit Bäckerhefe gemachten Versuche wiederholt werden.

Es wurde in der S.D. 1:200 gearbeitet und folgende Versuchszusammenstellungen mit den entsprechenden der Bäckerhefe verglichen:

1. Reinhefe in Leitungswasser. 3. Reinhefe in Glucoselösung.
2. Reinhefe in Aq. dest. 4. Reinhefe in Schopfer-Lösung.

Die Ergebnisse veranschaulicht Abb. 10.

a) In Leitungswasser ist das Verhalten der Reinhefe ähnlich dem der Bäckerhefe (vgl. Abb. 1). Die Zahl der roten Zellen ist nach 30 min höher als bei Bäckerhefe, später geringer, und nach 24 Std ist auch hier alles rot gefärbt. Der Prozentsatz grüner Zellen verringert sich in der gleichen Weise. Die Qualität der Grünfärbung entspricht nicht der der

Bäckerhefe. Sie ist hier viel blasser und uneinheitlich, da sie von Grün nach Gelb wechselt; dunkel- und leuchtend grüne Zellen sieht man nur selten. Eine Differenzierung in verschiedene Farbqualitäten war nicht durchführbar.

b) In *Aq.dest.* (vgl. dazu Abb. 3) ist die Zahl der rotfluoreszierenden Zellen wesentlich höher als bei Bäckerhefe und erreicht schon nach 8 Std 100%. Es treten keinerlei oder nur ganz schwach gefärbte grüne Zellen auf.

c) In *Glucoselösung* verläuft die Anfärbung der Reinhefe in den ersten 8 Std *vollständig gleich der in Leitungswasser*. Nach 24 Std sind die grünen Zellen entfärbt. Nach 48 Std kann auch eine (zumindest partielle) *Entfärbung der roten Zellen* festgestellt werden. Eine Auszählung ist in diesem Stadium nicht mehr möglich, da alle Zwischenstufen zwischen leuchtend roten und ganz blassen, nur noch an wenigen Stellen gefärbten Zellen vorhanden waren; eine Zuordnung erschien daher unangebracht. Die Werte sind in das Diagramm nicht eingezeichnet worden.

Wichtig ist, daß die Rotfluorochromierung der Reinhefe in Leitungswasser durch Zugabe von Glucose in den ersten 24 Std *nicht* beeinflußt wird.

d) In *Nährlösung* gefärbt, waren Reinhefezellen unter dem Fluoreszenzmikroskop überhaupt nicht mehr auszuzählen. Grüne Zellen traten nicht auf, und die Fluoreszenz der roten war so schwach, daß keine reproduzierbaren Werte erhalten wurden. Nach 24 Std nahm die Intensität der Rotfärbung etwas zu, aber die Zellen waren wie unter c) so unterschiedlich gefärbt, daß eine Auszählung keinen Erfolg versprach.

Ohne eine eingehende Besprechung der hier vorgelegten Färbefunde vorwegnehmen zu wollen, lassen sich bereits folgende Feststellungen treffen: 1. Verschiedene Hefen zeigen unter gleichen äußeren Bedingungen nicht das gleiche Anfärbebild. 2. Bei einundderselben Hefe und gleicher Suspensionsdichte wird das Färbebild unterschiedlich verändert, je nach der Art und der Intensität der Stoffwechselvorgänge, ohne daß indessen eine direkte Proportionalität aufgezeigt werden könnte. Der kausale Zusammenhang zwischen der Anfärbung und der (stoffwechsel-) physiologischen Aktivität der Zelle ist wesentlich verwickelter, als daß man den physiologischen Zustand an Hand des Färbebildes charakterisieren bzw. umgekehrt aus der gesetzten Veränderung des physiologischen Zustandes die darauffolgende Veränderung des Färbebildes voraussagen könnte. Es schien daher angezeigt zu prüfen, ob etwa die physikalisch zu messende Farbstoffaufnahme besser zum Stoffwechsel in Beziehung gesetzt werden kann als der mikroskopische Färbefund.

2. Die Bestimmung der Farbstoffaufnahme.

Analog der von KÖLBEL (1947) angewendeten Methode wurde die in der Suspensionsflüssigkeit zurückbleibende Farbstoffmenge photometrisch bestimmt. Die Suspensionen wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten, wie bei der Fluoreszenzkontrolle. Nach 30 min, $1\frac{1}{2}$, $2\frac{1}{2}$, 5, 8, 24 und 48 Std wurden Proben entnommen, die Hefe ab-

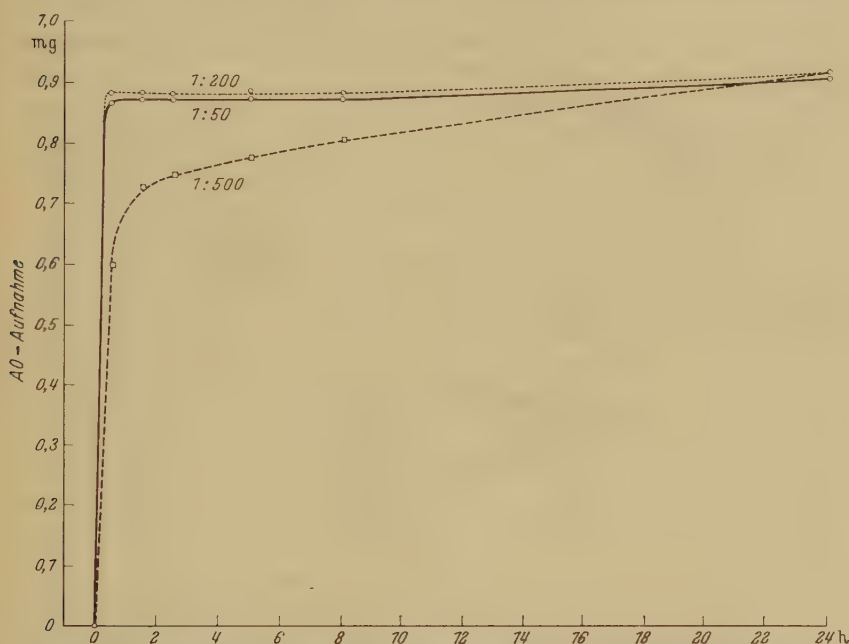


Abb. 11. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe in Aq. dest., S.D. 1:50, 1:200, und 1:500. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

zentrifugiert und die überstehende Lösung mit dem PULFRICH-Photometer gemessen. Die Farbstoffkonzentration ließ sich dann aus den Extinktionswerten mit Hilfe einer Eichkurve berechnen. Die Differenz zu der zu Versuchsbeginn in der Suspensionsflüssigkeit befindlichen Farbstoffmenge ergibt die von allen Hefezellen insgesamt aufgenommene Menge Farbstoff.

a) Die Farbstoffaufnahme bei verschiedener Suspensionsdichte. Zuerst wurde die Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe bei Anfärbung in Aq. dest. in den S.D. 1:50, 1:200 und 1:500 gemessen (Abb. 11).

Die Kurven verlaufen bei 1:50 und 1:200 praktisch gleich. Bereits nach $\frac{1}{2}$ Std befindet sich mehr als 90% der innerhalb von 24 Std aufgenommenen Farbstoffmenge in den Zellen. Bei 1:500 ist die Aufnahme

zu Versuchsbeginn verzögert, erreicht aber nach 24 Std den gleichen Wert wie bei 1:50 und 1:200.

Bei einunddemselben Suspensionsmittel — in diesem Falle Aq. dest. — wird von Bäckerhefe im „kritischen Bereich“ der Suspensionsdichte (s. S. 330) innerhalb von 24 Std in allen Suspensionsdichten die *gleiche* Farbstoffmenge aufgenommen.

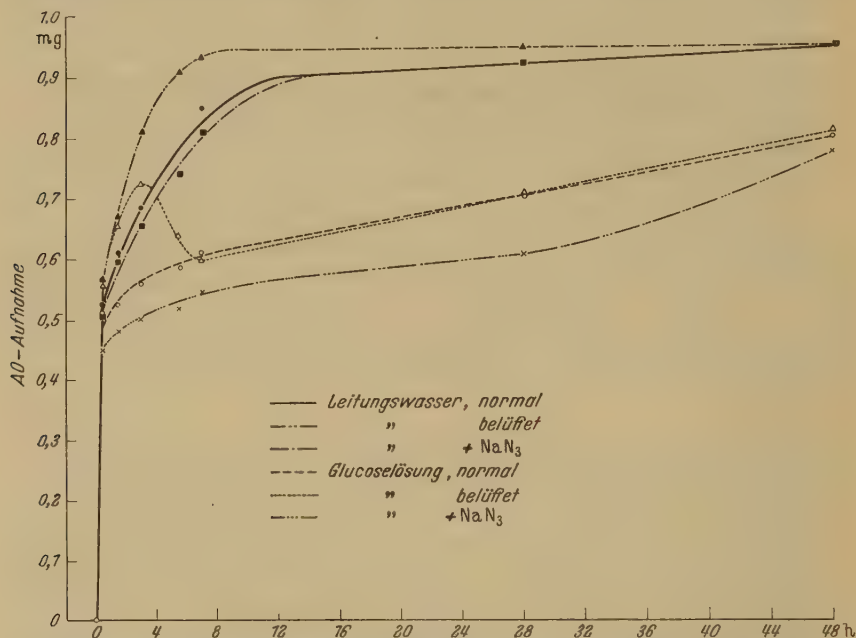


Abb. 12. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung bei Belüftung und Azidzusatz. S.D. 1:200. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

b) Die Farbstoffaufnahme bei Belüftung und Azidzusatz. Bäckerhefe wurde 1:200 in reinem Leitungswasser und in Glucoselösung suspendiert und mit AO versetzt. Die Kontrollen blieben unbeeinflusst, jeweils ein Ansatz wurde belüftet, ein weiterer mit Natriumazid (10^{-3} mol) versetzt (Abb. 12).

Bei den *Kontrollen* ist die Farbstoffaufnahme in Glucoselösung im Vergleich zu derjenigen in Leitungswasser *verzögert*.

Belüftung *beschleunigt* die Farbstoffaufnahme in Leitungswasser und Glucoselösung. In letztere wird nach 3 Std wieder Farbstoff *abgegeben*, bis nach 7 Std der entsprechende Wert der Kontrolle erreicht wird. Während der weiteren Versuchsdauer verlaufen beide Kurven gleich.

Azid *verzögert* die Farbstoffaufnahme. Die Verzögerung ist in Leitungswasser weniger ausgeprägt als in Glucoselösung als Suspensionsmittel.

c) Die Farbstoffaufnahme bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit (unbelüftete Kulturen). Bäckerhefe und Reinhefe wurden 1:200 suspendiert in

- a) Leitungswasser, c) 1%iger Glucoselösung,
b) Aq. dest., d) Schopfer-Lösung.

Beim Vergleich der Kurven in Abb. 13 sieht man, daß Bäckerhefe in allen Fällen mehr Farbstoff aufnimmt als Reinhefe.

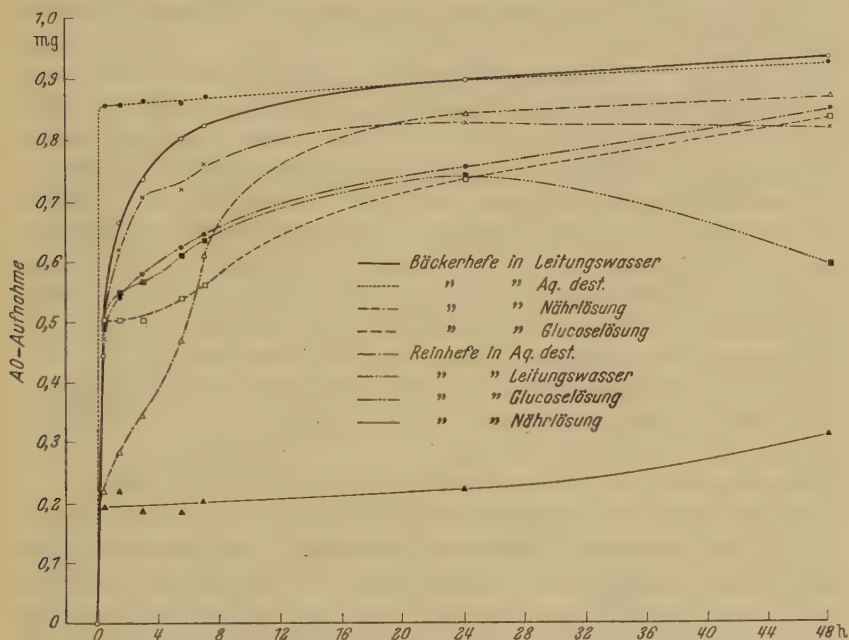


Abb. 13. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe und Reinhefe in verschiedenen Suspensionsflüssigkeiten. S. D. 1:200. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

In *Aq. dest.* verläuft die Farbstoffaufnahme bei beiden Hefen am schnellsten. Bäckerhefe hat nach 30 min den weitaus größten Teil des Farbstoffes aufgenommen (85%), und bis zum Versuchsende werden nur noch weitere 9% der Suspensionsflüssigkeit entzogen. Bei Reinhefe ist die Farbstoffaufnahme nach ungefähr 12 Std mit 83% beendet.

In *Leitungswasser* wird der Farbstoff von beiden Hefen *langsamer* aufgenommen: Bei Bäckerhefe erreicht die Aufnahme erst nach 24 Std, bei Reinhefe sogar erst nach 40 Std den gleichen Wert wie in destilliertem Wasser.

In *Glucoselösung* nimmt Bäckerhefe den Farbstoff noch langsamer auf und hat nach 48 Std erst 84% gespeichert. Die entsprechende Kurve der Reinhefe verläuft während der ersten 24 Std gleich der in *Leitungs-*

wasser aufgenommenen. Dann wird der Farbstoff wieder abgegeben: *die Farbstoffmenge in der Suspensionsflüssigkeit steigt von 25% nach 24 Std wieder auf 40% nach 48 Std an.*

In *Nährlösung* unterscheiden sich beide Hefen am stärksten: Bäckerhefe speichert hier *mehr* Farbstoff als in Glucoselösung, Reinhefe nimmt hingegen in der ersten $\frac{1}{2}$ Std *nur 20%* des Farbstoffes und während der folgenden Versuchszeit *nur noch weitere 10%* auf.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Anfärbung erkennt man folgendes:

a) Bei den Färbeversuchen konnte verschiedentlich (S. 337) in ein und demselben Suspensionsmittel festgestellt werden, daß eine Verringerung der Suspensionsdichte zu einem höheren Prozentsatz rotfluoreszierender Zellen führt. Dieses Verhalten läßt sich leicht durch eine *gleiche Gesamtfarbstoffaufnahme* innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches der Hefe erklären. Bei geringer Suspensionsdichte steht der *einzelnen Hefezelle* mehr Farbstoff zur Verfügung als bei höherer.

b) Bei Beeinflussung des Stoffwechsels findet man mit beiden Untersuchungsmethoden gleichgerichtete Ergebnisse: Belüftung beschleunigt Farbstoffaufnahme und Anfärbung, Azid verzögert sie (vgl. Abb. 5, 8 und 12). In Glucoselösung ist die reversible Erhöhung der Farbstoffaufnahme nur mit dem Auftreten der grünen Zellen mit gelbroten Einschlüssen zu vergleichen (s. Abb. 7). Die Entfärbung der grünen Zellen findet keinen Niederschlag in der Farbstoffaufnahmekurve.

c) Bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit ist ein Vergleich nicht so einfach durchzuführen. Auf den ersten Blick läßt sich sagen, daß eine Parallelisierung von Farbstoffaufnahme und Anfärbung allenfalls bei Reinhefe möglich erscheint, bei Bäckerhefe schwieriger ist und bei gemeinsamer Betrachtung beider Hefen zu erheblichen Unstimmigkeiten führt.

Eine eingehende Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit denen der Anfärbung soll erst im III. Teil zusammen mit den noch folgenden über die Wirkungen des Farbstoffes auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Zellen unternommen werden.

3. Die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Arbeiten von STRUGGER (1940) und KÖLBEL (1947) ließen die Wichtigkeit der Einhaltung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration des Farbbades erkennen. Von diesen Autoren wird empfohlen, zur Erzielung gleichmäßiger Färbeergebnisse und zur Ausschaltung schädlicher Wirkungen in neutraler, gepufferter Außenlösung zu arbeiten.

Es war daher wünschenswert, die im Verlaufe der 24- bzw. 48-Std-Versuche in der Außenlösung auftretenden p_H -Änderungen zu verfolgen.

Aus einer großen Anzahl von Versuchsergebnissen seien hier diejenigen angeführt, die sich auf die gleichen Versuchsanordnungen wie bei der photometrischen Farbstoffbestimmung (bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit) beziehen. Als Kontrollen dienten gleiche Ansätze ohne AO (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Änderungen der p_H -Werte. S.D. 1:200.*

Versuch	Kontrolle			AO-Zusatz		
	Versuchs- beginn p_H	nach 24 Std p_H	nach 48 Std p_H	Versuchs- beginn p_H	nach 24 Std p_H	nach 48 Std p_H
1. Leitungswasser						
Bäckerhefe	6,4	7,1		6,1	7,0	
Reinhefe	7,3	7,4		7,1	7,2	
2. Aq. dest.						
Bäckerhefe	6,7	7,4		5,5	6,5	
Reinhefe	5,7	6,7		4,8	6,0	
3. Glucoselösung						
Bäckerhefe	6,2		4,5	6,4		3,9
Reinhefe	7,1		4,2	7,1		4,8
4. Nährlösung						
Bäckerhefe	4,5		3,1	4,4		3,4
Reinhefe	4,6		3,1	4,5		3,4

In Aq. dest. und Leitungswasser findet eine leichte Absäuerung statt, wohl als Folge des von BOGEN und KESER (1954) festgestellten und später noch in dieser Arbeit zu behandelnden Eiweißabbaues. Bei Glucosezusatz und in Nährlösung führen die sich anhäufenden Stoffwechselprodukte zu einer Ansäuerung. Bei Reinhefe und Bäckerhefe in Nährlösung ist die p_H -Änderung gleich groß.

Zumindest bei Leitungswasser liegt der p_H -Wert der Außenlösung während des ganzen Versuches in der Nähe des Neutralpunktes, so daß durchgehend „optimale“ Färbebedingungen gegeben sind. Gerade hier aber bestehen (bei Bäckerhefe) extreme Unterschiede sowohl in der Anfärbung als auch in der Farbstoffaufnahme zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende. Es ist völlig ausgeschlossen, diese Differenzen auf p_H -Unterschiede in der Außenlösung zurückzuführen.

In allen anderen Fällen erhöhen sich Farbstoffaufnahme und Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen im Verlaufe des Versuches ebenfalls; gleichwohl verschiebt sich der p_H -Wert der Außenlösung in Aq. dest. vom sauren zum neutralen, in Glucoselösung vom neutralen zum sauren und in Nährlösung vom sauren zum noch stärker sauren Bereich. (Ausgenommen ist lediglich Reinhefe in Glucoselösung: Hier nehmen nach anfänglicher Steigerung Farbstoffaufnahme und Rotfluoreszenz

gegen Versuchsende wieder ab.) Auch hier sind die p_H -Änderungen in der Außenlösung nicht maßgebend für Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Demzufolge war es auch nicht möglich, rotfluorochromierte Hefezellen (Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:200, nach 24stündiger Anfärbung) durch Übertragung in ein auf p_H 3,5 *gepuffertes Farbbad* (Phosphatpuffer) zu entfärben. Die gleiche Hefe wurde jedoch nach Übertragung in *Glucoselösung* innerhalb von 8 Std soweit entfärbt, daß das gleiche Zahlenverhältnis auftrat, wie in solcher Bäckerhefe, die von vornherein in Glucoselösung fluorochromiert wurde (40—45% rot, 55—60% grün bzw. farblos). Daraus wird besonders deutlich, daß der *Stoffwechsel* und damit auch der p_H -Wert im Zellinneren die Farbstoffaufnahme bestimmt (vgl. S. 368).

4. Die Beeinflussung des Wachstums.

Nachdem BOGEN (1953) eine Hemmung des Wachstums von Hefezellen durch AO-Einwirkung beobachtet hatte, war es erforderlich, diesen Einfluß genauer zu untersuchen, insbesondere bei verschiedenen Suspensionsdichten und Ernährungsbedingungen, und zwar sowohl an Bäckerhefe als auch an Reinhefe.

Die Suspensionen wurden wie bei den vorhergehenden Versuchen hergestellt und behandelt. Zu Versuchsbeginn, nach 4, 8, 24 und 48 Std wurden Proben entnommen und mit Hilfe der Zählkammer nach THOMA unter dem Mikroskop die Suspensionsdichte festgestellt. Nach 24 bzw. 48 Std wurde von der Suspensionsflüssigkeit abzentrifugiert und die Hefezellen aus allen Versuchsreihen erneut in einer, der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge entsprechenden, Menge *Nährlösung* nach SCHOPFER ohne AO-Zusatz suspendiert. In diesen neuen Suspensionen wurde dann die Zellzahl sofort, nach 8, 24 und 48 Std in der angegebenen Weise ermittelt. Kontrollen blieben ohne AO.

a) **Das Wachstum in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit.** Es wurden die gleichen 4 Kombinationen, wie in den vorangehenden Versuchen, angesetzt:

1. Bäckerhefe und Reinhefe in Leitungswasser.
2. Bäckerhefe und Reinhefe in Aq. dest.
3. Bäckerhefe und Reinhefe in Glucoselösung.
4. Bäckerhefe und Reinhefe in Nährlösung.

Bei 1. und 2. wurde nach 24, bei 3. und 4. nach 48 Std abzentrifugiert. Darstellung der Ergebnisse in Abb. 14.

α) *Wachstum bis zum Abzentrifugieren.* Wegen Nährstoffmangels findet weder in Leitungswasser noch in Aq. dest. ein Wachstum statt. In reiner Glucoselösung nimmt die Zellzahl in 48 Std um 45% (Bäckerhefe) bzw. 20% (Reinhefe) zu; bei AO-Zusatz wächst die Bäckerhefe noch um 28%, die Reinhefe nicht mehr. In Schopfer-Lösung ist das Wachstum erheblich stärker: In der AO-freien Nährlösung nimmt die Zellzahl um 238% (Bäckerhefe) bzw. 74% (Reinhefe) zu; bei AO-Zusatz

wächst Bäckerhefe hier gleichfalls noch um 20%, dagegen ist das Wachstum der Reinhefe während der ersten 24 Std vollständig gehemmt; dann erfolgt ein steiler Anstieg um 115%, womit der Kontrollwert noch überschritten wird. Gleichzeitig ist das Auftreten größerer Hefemengen auf der Oberfläche der Nährlösung bemerkbar.

β) Wachstum nach Übertragung in frische, AO-freie Nährlösung. Die unbehandelten Kontrollen der Bäckerhefe wachsen in allen Kombi-

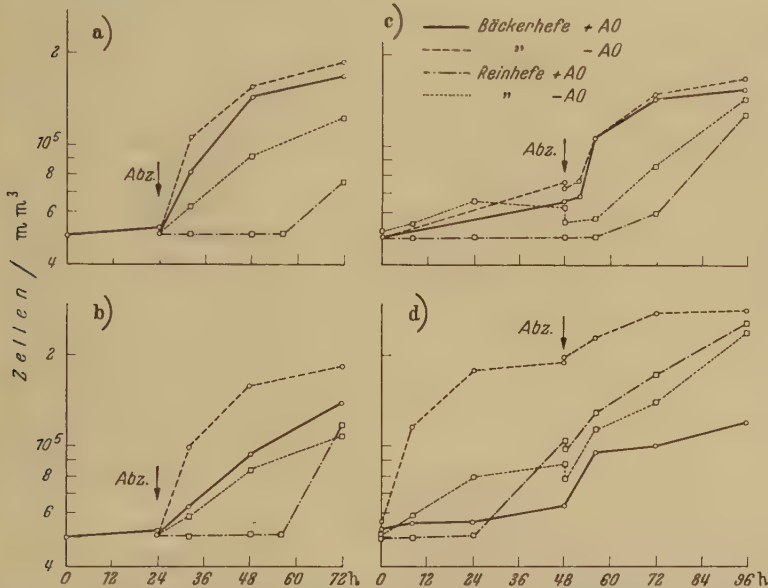


Abb. 14. Das Wachstum von Bäckerhefe und Reinhefe in Leitungswasser (a), Aq. dest. (b), Glucoselösung (c) und Nährlösung (d). S.D. 1:200. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

nationen besser als die der Reinhefe. Bei der Besprechung der Einzelheiten ist es zweckmäßig, Bäckerhefe und Reinhefe zu trennen.

AO-behandelte *Bäckerhefe* zeigt, wenn sie aus Leitungswasser- oder Glucoseversuchen stammt, einen Wachstumsanstieg, der nur wenig unter dem der Kontrolle liegt, während das Wachstum der aus destilliertem Wasser und besonders der aus Nährlösung übertragenen Hefen bedeutend stärker gehemmt ist.

Bei *Reinhefe* bleibt nach vorheriger AO-Behandlung in Aq. dest. und Leitungswasser das Wachstum über mindestens weitere 32 Std sistiert; erst dann setzt ein lebhafter Anstieg ein. Bei der Hefe des Glucoseversuches ist ein langsamer Anstieg schon nach 24 Std bemerkbar; die in Schopfer-Lösung vorbehandelte Hefe liefert schließlich ein so starkes Wachstum, daß die Kurve immer über der der Kontrolle bleibt.

Beim Wachstum der Reinkulturen sind hier, wie auch bei allen späteren Versuchen, stets Oberflächenhefen auf der Nährlösung zu beobachten.

In Aq. dest. und in Leitungswasser tritt keine Änderung in der Suspensionsdichte ein, die eine Abweichung in der Anfärbung hervorrufen könnte. In Glucose- und Schopfer-Lösung findet bei Bäckerhefe ein Wachstum um ungefähr 20 % statt, also eine Erhöhung der S.D. von 5,2 auf $6,3 \cdot 10^4$ Zellen/mm³. Bei dieser S.D. ergaben die Ermittlungen von BOGEN (1953) bei Anfärbung in destilliertem Wasser nach 24 Std für Bäckerhefe ein Verhältnis von 65 % Rotfluoreszenz zu 35 % Grün-

fluoreszenz. Die hier gemessenen Werte lagen für Bäckerhefe in Glucoselösung bei 40 % rot zu 60 % grün, in Schopfer-Lösung bei 88 % rot zu 12 % farblos; eine Änderung der Suspensionsdichte durch Zellvermehrung kann diese Unterschiede daher *nicht* bedingen.

Die Ergebnisse zeigen, daß zwischen Wachstumshemmung und Farbstoffaufnahme keine Proportionalität besteht. Das wird besonders deutlich bei der Reinhefe: diese nimmt nur 20 % des gesamten verfügbaren Farbstoffes auf und erscheint daher im Fluoreszenzmikroskop kaum gefärbt, ist aber in ihrem Wachstum über mindestens 24 Std vollständig gehemmt.

b) Die Bedeutung der Suspensionsdichte. Als nächstes war die Nachprüfung wichtig, ob man

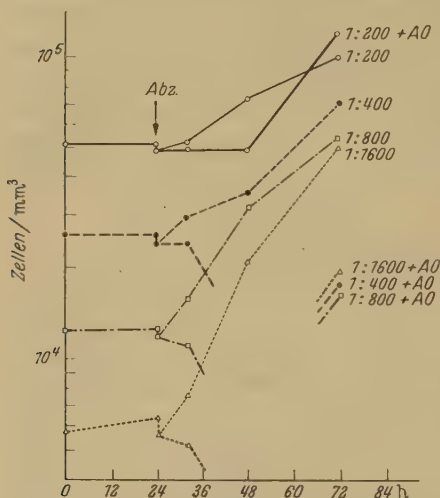


Abb. 15. Wachstum von Reinhefe in Aq. dest., S.D. 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

bei Erniedrigung der Suspensionsdichte, d. h. Erhöhung der Farbstoffmenge je Zelle, zu einem Bereich kommt, in dem der Farbstoff zu einer vollständigen und dauernden Unterbindung des Wachstums führen kann, die auch nach Übertragung in frische, AO-freie Nährlösung anhält. Da hier mit Resistenzunterschieden der verschiedenen Heferassen zu rechnen ist, können diese Versuche nur mit Reinhefe durchgeführt werden. Von dieser wurden folgende Suspensionen in destilliertem Wasser hergestellt:

1. 1:200 ($= 5 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
2. 1:400 ($= 2,5 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
3. 1:800 ($= 1,25 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
4. 1:1600 ($= 0,63 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).

Die Ansätze wurden wie unter 4a behandelt. Das Ergebnis ist aus Abb. 15 abzulesen. In Aq. dest. findet, wie zu erwarten war, in keinem Falle ein Wachstum statt.

Nach Übertragung in AO-freie Nährlösung wachsen die ungefärbten Suspensionen umso stärker, je niedriger die Dichte in der Ausgangs-suspension war:

nach 48 Std bei 1:200 um 93%, 1:800 um 355%,
1:400 um 174%, 1:1600 um 853%.

Es besteht eine umgekehrte, nahezu lineare Proportionalität.

Bei den AO-behandel-ten Suspensionen ist die S.D. 1:200 bereits be-schrieben. Bei den niedri-geren S.D. tritt ein sehr starker Bakterienbefall auf, der eine Auszählung nach 24 Std unmöglich macht. Zu diesem Zeit-punkt sind nur noch sehr wenige lebende Zellen vor-handen. Nach 48 Std treten aber bei allen 3 Suspensionsdichten wie-der Zellen in größerer Anzahl auf, und zwar bei allen dreien etwa gleichviel. Die neu ge-bildeten Zellen zeigen kei-nerlei Bakterienbefall mehr und sind in ihrer Gestalt nicht wesentlich von normalen Hefezel-len verschieden.

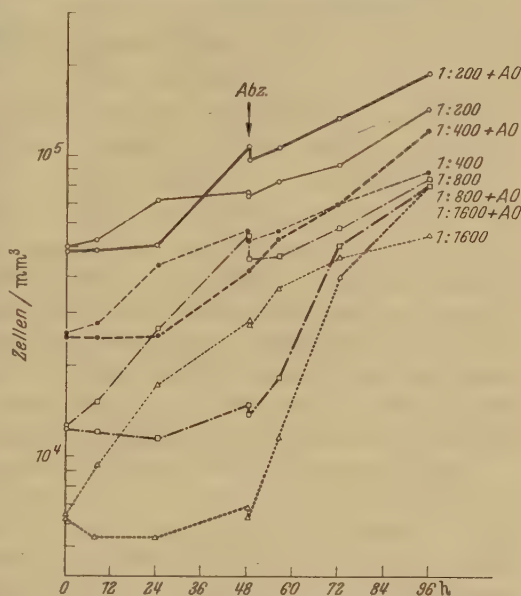


Abb. 16. Wachstum von Reihhefe in Schopfer-Lösung S. D. 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600. Ordinate: Zellen je mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

Dieses spricht dafür, daß bei geringer Suspensionsdichte fast alle Zellen abgetötet werden. Die Ausscheidung von Bakterienhemmstoffen hört auf, und die abgetöteten Zellen werden von den Bakterien aufgezehrt. Nur wenige Zellen überleben und gelangen zu neuem Wachstum. Die Wirkung des AO könnte demnach in einer Selektion bestehen. Hierzu sollen später weitere Anhaltspunkte treten (s. S. 354). Es steht jedenfalls fest, daß nach Unterschreitung der S.D. 1:400 die Farbstoffmenge ausreicht, um die Zellen der Population in Aq.dest. abzutöten. Das Überleben der selektierten Zellen ist dann unabhängig von der Farbstoffkonzentration.

Der gleiche Versuch wurde mit Nährlösung nach SCHOPFER an Stelle von Aq.dest. wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

Bis zum Abzentrifugieren wachsen auch hier die Kontrollen um so stärker, je niedriger die Dichte der Ausgangssuspension war:

nach 48 Std bei 1:200 um 53%, 1:800 um 310%,
1:400 um 124%, 1:1600 um 335%.

Mit AO-behandelte Hefen wachsen 24 Std lang *nicht*, dann erfolgt ein Anstieg *proportional* der S.D.:

nach weiteren 24 Std bei

1:200 um 125%, 1:800 um 32%,
1:400 um 65%, 1:1600 um 25%.

Nach der Übertragung in AO-freie Nährlösung wachsen diese Hefen *schneller* und zwar nunmehr *umgekehrt proportional* der S.D.:

nach 48 Std bei 1:200 um 98%, 1:800 um 485%,
1:400 um 200%, 1:1600 um 1350%.

Auch hier besteht also eine Abhängigkeit der AO-Wirkung von der Suspensionsdichte: Anfänglich ist das Wachstum um so geringer, je niedriger die Suspensionsdichte ist. Nach anschließender Übertragung in AO-freie Nährlösung besteht jedoch umgekehrte Proportionalität. Diese läßt sich zunächst damit erklären, daß bei gleichem Lösungsvolumen die je Zelle zur Verfügung stehende Nährstoffmenge größer und leichter erreichbar ist, je geringer die Suspensionsdichte ist.

Das Verhalten der Zellen nach Anfärbung in Nährlösung entspricht nun freilich *nicht mehr dem einer einfachen Selektion*. Das *sofort nach der Übertragung* in AO-freie Nährlösung einsetzende starke Wachstum läßt an den Ablauf *adaptiver* Vorgänge denken, wobei diese (in AO-Lösung) um so mehr verzögert sind, je mehr Farbstoff der Zelle zur Verfügung steht. Auch diese Frage wird weiter unten nochmals experimentell behandelt (s. S. 353).

c) Der Einfluß der einzelnen Bestandteile der Nährlösung. Da die Wirkung des AO auf den Proteinumbau bekannt ist (BOGEN und KESER 1954), war es von Interesse festzustellen, ob das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Bestandteile der Nährlösung einen Einfluß auf die Wachstumswirkung des AO hat.

Es wurde mit Bäckerhefe und Reinhefe in der Anfangskonzentration von 1:200 gearbeitet. In der als Suspensionsmittel dienenden Aq. dest. waren wechselweise die einzelnen Bestandteile der Nährlösung nach SCHOPFER einzeln oder im Gemisch gelöst. Die Versuchszusammenstellungen und -ergebnisse sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß bei den Kontrollen in allen Kombinationen der Zuwachs immer geringer ist als in vollständiger Nährlösung.

Ferner wächst in den Kontrollen die Bäckerhefe schneller als die Reinhefe, während AO-behandelte Suspensionen das umgekehrte Ver-

Tabelle 4. *Wachstum bei Zusatz der einzelnen Bestandteile der Nährlösung nach SCHOPFER zu Aq. dest. als Suspensionsmittel.*

Zuwachs in Prozenten der Ausgangswerte. Nach Übertragung in AO-freie, vollständige Nährlösung diente die bei der Übertragung ermittelte S.D. als Ausgangswert. Der Gesamtzuwachs bezieht sich auf die S.D. (1:200) zu Beginn des Versuches.

Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit	Kontrolle ohne AO			Versuch mit AO		
	Zuwachs bis zum Abzentrifugieren	Zuwachs in AO-freier Nährlösung	Gesamtzuwachs	Zuwachs bis zum Abzentrifugieren	Zuwachs in AO-freier Nährlösung	Gesamtzuwachs
	%	%	%	%	%	%
Glucose (5%)						
Bäckerhefe	36	140	222	0	37	
Reinhefe	11	122	130	0	99	
Glucose + Asparagin						
Bäckerhefe	58	107	212	0	29	
Reinhefe	17	130	154	0	173	
Glucose + Asparagin + Phosphat						
Bäckerhefe	70	121	244	0	98	
Reinhefe	19	131	153	0	180	
Nährlösung ohne Asparagin						
Bäckerhefe	74	112	228	32	67	124
Reinhefe	23	132	168	0	208	
Nährlösung ohne Phosphat						
Bäckerhefe	58	104	183	0	59	
Reinhefe	37	108	161	0	195	
Nährlösung, vollständig						
Bäckerhefe	238	43	500	20	89	125
Reinhefe	74	207	475	115	169	515

halten zeigen. Auffallend ist, daß außer der vollständigen Nährlösung nur die Asparagin- und damit N-freie Nährlösung den angefärbten Zellen der Bäckerhefe ein Wachstum ermöglicht.

Daraus darf man den Schluß ziehen, daß die AO-Behandlung dann am meisten schädigt, wenn der normale Stoffwechsel besonders rege ist. Andererseits ist aber diesen Zellen auch die Möglichkeit gegeben, nach Entfernung des Farbstoffes normal oder vielleicht sogar schneller zu wachsen.

In den folgenden Versuchen wurde das Asparagin durch andere Stickstoffquellen ersetzt. Verwendet wurde diesmal nur Bäckerhefe, die noch nicht an den Asparagin-N adaptiert war, in Schopfer-Lösung S.D. 1:200, Stickstoff wurde jeweils im gleichen molaren Verhältnis zugesetzt als Asparagin (1⁰/₀₀), Ammoniumsulfat (0,9⁰/₀₀), Kalium-

nitrat (1,35‰) oder Harnstoff (0,4‰). Auf eine graphische Darstellung kann verzichtet werden. Das Wachstum der Kontrollen wird wie folgt gefördert:

Asparagin < Ammonsiumsulfat < Kaliumnitrat < Harnstoff.

Die mit AO versetzten Suspensionen ergeben bei der letzten Auszählung die *umgekehrte* Reihenfolge. Die Werte liegen zwar dicht zusammen, und die Wachstumskurven überschneiden sich hier und da; dennoch sprechen die hier und im oben angeführten Versuch erhaltenen Ergebnisse dafür, daß eine Veränderung im N-Haushalt der Zelle für die AO-Wirkung insofern von Bedeutung ist, als einer Erhöhung des N-Umsatzes eine stärkere Hemmung des Wachstums entspricht. Weitere Aufschlüsse müssen durch biochemische Bestimmungen des N-Umsatzes mit markiertem N gewonnen werden.

d) Versuche zur Erklärung des Wachstums in AO-haltiger Nährlösung.
Es bleibt vorläufig noch die Frage zu beantworten, weshalb in AO-haltiger Nährlösung, besonders bei Reinkulturen, ein Wachstum auftritt, das unter Umständen stärker sein kann, als das der Kontrolle.

Die Beobachtungen hatten ergeben, daß bei der Anfärbung die feuerrot gefärbten Zellen mit „destruiertem“ Plasma stark geschrumpft waren, und BOGEN und KESER (1954) konnten zeigen, daß mit der Zellschädigung durch AO eine Erhöhung der Permeabilität und damit verbunden ein Austritt von Aminosäuren und vermutlich noch anderen Substanzen aus der Zelle einhergeht. Nun hatten LOOFBOUROW und Mitarbeiter (1947), WEBB und LOOFBOUROW (1947), ferner LOOFBOUROW (1947) beschrieben, daß bei der Schädigung von Hefezellen durch UV in der Suspensionsflüssigkeit Vitamine der B-Gruppe, Aminosäuren und Nucleinsäuren auftreten, die beim Zusatz zu einer geeigneten Nährlösung das Wachstum von Test-Hefestämmen stark beschleunigen können, was die Autoren als Wundhormonwirkung deuten. Es lag daher nahe anzunehmen, daß bei der Schädigung durch AO außer den Aminosäuren weitere wuchsfördernde Stoffe ausgeschieden werden, die in Nährlösung zu einem übernormalen Wachstum der ungeschädigten Zellen führen.

Das von LOOFBOUROW angegebene Verfahren wurde folgendermaßen abgewandelt: Eine Störung der Permeabilität und damit verbundene Ausscheidung von Aminosäuren war besonders in Aq.dest. bekannt. Daher wurden Bäckerhefe und Reinhefe 1:200 in Aq.dest. verteilt, mit AO versetzt und 24 Std lang bei 25°C stehen gelassen. Kontrollen blieben ohne AO-Zusatz. Anschließend wurde abzentrifugiert und in den Suspensionsflüssigkeiten der noch verbliebene AO-Gehalt photometrisch bestimmt. Der Rückstand wurde mit einer kleinen Menge Wasser ausgewaschen und nach dem erneuten Abzentrifugieren die Waschflüssigkeiten den ursprünglichen Suspensionslösungen zugefügt. Dann wurden alle 4 Lösungen durch Zugabe der notwendigen Salze zur vollständigen Nährlösung ergänzt. 2 Kontrollnährlösungen wurden mit Aq.dest. angesetzt und nunmehr alle Flüssigkeiten auf den gleichen AO-Gehalt (1:160000) gebracht. Darauf wurde in den aus Bäckerhefe stammenden Suspensionsflüssigkeiten Bäckerhefe, in denen aus Reinhefe diese im Verhältnis 1:200 suspendiert und in den nächsten 48 Std das Wachstum gemessen.

Die Unterschiede der Wachstumskurven sind so gering, daß von einer Wachstumsförderung durch etwa ausgeschiedene Substanzen nicht gesprochen werden

kann. Damit ist zwar nicht ausgeschlossen, daß derartige Stoffe überhaupt vorhanden sind; sie können hier aber nicht zur Wirkung kommen, da andere, begrenzen-
 Bedingungen vorliegen, wie vielleicht fehlende Belüftung oder andere.

Daher mußte das verstärkte Wachstum in Nährlösung anderen Faktoren zugeschrieben werden. Es lag nahe, an eine Adaptation der Hefe an AO zu denken, wie sie BASKETT (1951) beim Wachstum von *Bact. lactis aerogenes* in Gegenwart von Proflavin (2:8-Diaminoacridin) nachgewiesen hatte.

Zur Nachprüfung wurde Reinhefe 1:200 in Nährlösung suspendiert, mit AO versetzt, und das Wachstum der Zellen in der üblichen Weise

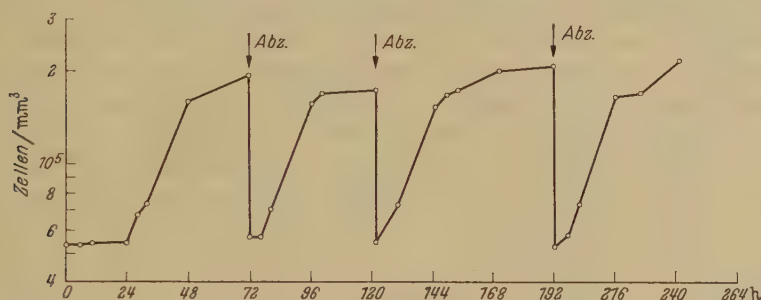


Abb. 17. Versuch über die Adaptation von Reinhefen an AO in Schopfer-Lösung. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer AO-haltiger Nährlösung erneut auf die S.D. 1:200 eingestellt.

verfolgt. Nach 72 Std wurde abzentrifugiert und die Hefe in neuer, AO-haltiger Nährlösung derart suspendiert, daß die ursprüngliche S.D. von 1:200 erneut als Ausgang diente. Das gleiche Verfahren wurde im Anschluß noch zweimal wiederholt. Die Meßergebnisse sind in Abb. 17 eingetragen.

Das Wachstum ist am *Anfang* über einen Zeitraum von 24 Std *gehemmt* und steigt dann an. Dies steht in Übereinstimmung mit den früheren Versuchen (s. S. 347). Nach der Übertragung in neue Nährlösung ist, obwohl jetzt zu dem in den Zellen bereits vorhandenen Farbstoff neuer hinzukommt, die *Dauer der Wachstumshemmung* auf 4 Std *verringert* und nach jeder weiteren Übertragung tritt *von Anfang an ein starkes Wachstum* ein. Der Anstieg ist *jedesmal der gleiche*.

Der Ausfall dieses Versuches, der eine Modifizierung des DELBRÜCK-LURIA-Testes nach HINSHELWOOD (DEAN und HINSHELWOOD 1951, BASKETT 1951) darstellt, beweist das Vorliegen einer *Adaptation der Hefe an den Farbstoff*.

Aus Abb. 16 war abgeleitet worden, daß das Wachstum in AO-Gegenwart um so geringer ist, je kleiner die Suspensionsdichte ist. Es findet in *Nährlösung* aber noch bei Suspensionsdichten statt, bei denen in Aq.dest. die Zellen längst abgetötet worden sind (Abb. 15); sie müssen

daher im ersteren Fall an AO adaptiert sein. Nach Übertragung in neue Nährlösung, diesmal ohne AO, erweisen sich *alle* Zellen des Nährlösungsversuches als voll lebensfähig, während die Zellen des Aq.dest.-Versuches mit Ausnahme der wenigen selektierten nicht mehr leben.

e) **Das Wachstum auf festen Nährböden.** Versuch 2b (S. 349) hatte es wahrscheinlich gemacht, daß eine der Wirkungen des AO die der Selektion sei. Zu einer Nachprüfung sind Kulturen in flüssigem Nährmedium nicht geeignet. Hier muß an die Stelle der Beobachtung des Wachstums einer ganzen Kultur die der einzelnen Zelle treten. Eine Möglichkeit dazu eröffnen die sog. „Plattenversuche“.

Vorbehandlung und Anfärbung entsprachen den bereits beschriebenen Versuchsreihen. Nach einer bestimmten Zeit, meist nach 24 oder 48 Std, wurde eine bestimmte Anzahl der behandelten Zellen nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren auf Platten gebracht und dort auf ihr Wachstum untersucht. Kontrollen blieben ohne AO-Zusatz.

Die Versuchszusammenstellungen und -ergebnisse sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Sie enthält die Koloniezahlen als Durchschnittswerte von 10—12 ausgezählten Platten. In der ersten Vertikalreihe sind jeweils die unbehandelten Kontrollen, in der zweiten die Versuche mit AO-Behandlung aufgeführt. Um das starke Streuen der Werte deutlich zu machen, wurde eine größere Anzahl von Versuchen aufgeführt.

Die Streuungen können zum Teil auf Versuchsfehlern beruhen, die durch das Verdünnen und Ausstreichen der Proben verursacht werden. Ferner weisen die Platten in Aq.dest., besonders bei der S.D. 1:800, starken Bakterienbefall auf (wie er ja auch bei den Versuchen in flüssigem Nährmedium festzustellen war). Indessen haben bereits DEAN und HINSHELWOOD (1951) bei ihren Versuchen mit Proflavin an *Bact. lactis aerogenes* darauf hingewiesen, daß bei analogen Plattenversuchen auch bei strenger Einhaltung steriler Bedingungen große Streuungen auftraten, die von einer großen Zahl verschiedener Faktoren, wie z. B. Zellalter, pH-Wert, Belüftung, Resistenz u. a. abhängig waren.

Daher läßt sich aus den Versuchen bei aller gebotenen Zurückhaltung folgendes entnehmen:

a) Bei der Anfärbung von Reinhefe in Aq.dest. nimmt die Koloniezahl mit der Suspensionsdichte ab. Aber auch bei 1:800 ist trotz starker Überfärbung noch rund 1% der Zellen lebensfähig (vgl. S. 349).

b) AO setzt die Überlebensrate bei Reinkulturen (1:200) in Aq.dest. stärker herab als in Leitungswasser. Dies entspricht der höheren Farbstoffaufnahme, wie sie 24 Std nach AO-Zugabe in destilliertem und in Leitungswasser gemessen wurde (vgl. Abb. 13).

c) Bei Bäckerhefe beträgt der Prozentsatz der gebildeten Kolonien bei AO-Behandlung in Aq.dest. 25—30%, in Glucoselösung 50 bis 60% (vgl. S. 334 und 333). In Leitungswasser ist die Koloniezahl unterschiedlich. Die Ergebnisse entstammen 2 Versuchsserien. Die erste (I) wurde im Winter 1953/54 aufgenommen und brachte rund 5% Kolonie-

bildung, die zweite (II) im Sommer 1954 mit 54,5%. Die Streuung innerhalb der beiden Reihen ist wesentlich geringer als die Abweichung der Mittelwerte beider Reihen voneinander. Dabei entspricht die Anzahl der bei II gebildeten Kolonien derjenigen in Glucose-lösung (50—60%). Bei beiden Serien fand nicht der gleiche Agar Verwendung. Die im Winter ausgegossenen Platten wiesen eine wesentlich festere Konsistenz auf als die im Sommer hergestellten. Zur Erklärung der unterschiedlichen Überlebensrate kann auf folgende Feststellungen hingewiesen werden:

1. Es ist möglich, in Leitungswasser zu 100% rot gefärbte Zellen nach Übertragung in AO-freie Glucoselösung zu 50—60% zu entfärben

Tabelle 5. *Das Wachstum auf festen Nährböden. (Zahl der gebildeten Kolonien.)*

a) Die Einwirkung von AO auf Reinhefe in Aq.dest. in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte.

1:50			1:200			1:800		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
152	91	59,8	139	4	2,9	126	1	0,8
118	79	67,0	117	2	1,7	104	1	1,0
121	122	100,0	144	6	4,2	129	1	0,8
141	88	62,4	171	10	5,9	93	1	1,1
201	127	63,2	170	29	17,0	168	3	1,8
733	507	69,2	741	51	6,9	620	7	1,1

b) Die Einwirkung von AO auf Reinhefe bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit S.D. 1:200.

Leitungswasser			Aq. dest.		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
124	36	29,0	166	7	4,2
180	44	24,4	124	6	4,8
85	14	16,5	126	6	4,8
75	20	26,7	62	2	3,2
74	24	32,4	76	2	2,6
80	11	13,8	90	1	1,1
88	14	15,9	69	1	1,5
98	16	16,3	107	1	0,9
142	66	46,5	140	5	3,6
108	44	40,7	137	3	2,2
148	54	36,5	150	1	0,7
117	18	15,4	155	7	4,5
152	31	20,4	181	14	7,7
152	45	29,6	131	15	11,5
223	110	49,4	179	71	39,6
131	72	55,0	136	66	48,5
141	54	38,3	199	47	23,6
153	76	49,6	201	41	20,4
154	99	64,3	193	38	19,7
2425	848	34,9	2622	334	12,7

Tabelle 5. (Fortsetzung.)

c) Die Einwirkung von AO auf Bäckerhefe bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit S.D. 1:200.

Leitungswasser			Aq. dest.			Glucoselösung		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
I. Winter 1953/54.								
165	3	1,8	187	13	7,0	152	74	48,7
189	24	12,7	209	124	59,2	219	157	71,8
187	3	1,6	131	40	30,5	199	81	40,7
155	7	4,5	196	23	11,7	162	80	49,4
206	7	3,4	188	33	17,5	160	52	32,5
902	44	4,9	911	233	25,6	892	444	49,8
II. Sommer 1954.								
224	120	53,6	215	105	48,8	139	119	85,5
230	126	54,8	205	22	10,7	188	119	63,2
222	105	47,3	213	29	13,6	179	110	61,5
192	105	54,8	212	89	42,0	128	74	57,8
202	127	62,9	212	63	29,7	157	90	57,2
228	126	55,3	217	52	24,0	142	71	50,0
			212	63	29,7			
			216	61	28,2			
1298	709	54,5	1702	484	28,4	933	583	62,5

(s. S. 346). Gleiches tritt nach Übertragung in Nährlösung ein, wenn auch hier dieser Prozentsatz wegen des bald eintretenden Wachstums nicht mehr reproduzierbar ist.

2. In Leitungswasser und Glucoselösung mit AO vorbehandelte Hefen zeigen nach Übertragung in AO-freie Nährlösungen *gleiches* Wachstum, das wenig unter dem der Kontrolle liegt (s. S. 347). Es ist somit möglich, einen Teil der rot fluoreszierenden Zellen zu entfärben und andererseits ursprünglich rot gefärbte Zellen zum Wachstum zu bringen. Die Übereinstimmung der Anzahl der in der Versuchsserie II gebildeten Kolonien mit dem Prozentsatz entfärbter Zellen spricht dafür, daß eben diese *entfärbten Zellen wieder wachsen* können. In der Reihe I war der Agar wesentlich fester, so daß den Zellen nur wenig Feuchtigkeit zur Verfügung gestanden haben dürfte; daher gingen Glucoseaufnahme und Farbstoffabgabe langsamer vonstatten. Die Zellen konnten dann innerhalb der Versuchszeit nicht mehr wachsen.

d) Ferner wurde im Hellfeldmikroskop der Prozentsatz derjenigen Zellen bestimmt, die nach AO-Behandlung in Glucoselösung und in Leitungswasser eindeutig am destruierten Plasma und an der Zellschrumpfung als geschädigt zu erkennen waren. Eine größere Anzahl von Auszählungen brachte bei beiden Suspensionsmitteln 40—50% destrukturierter Zellen. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die *irreversible* Rotfärbung in Glucoselösung und in Leitungswasser mit einer

Tabelle 6. *Quantitative Bestimmungen des N-Stoffwechsels.* Bäckerhefe in Aq. dest., Leitungswasser und Glucoselösung, 1 Std und 24 Std mit AO ungefärbt und ungefärbt. S.D. 1:200. N-Gehalt der 3 Fraktionen und Gesamt-N (a—d) sowie Trockengewicht der abentrüfferten Hefe (e), Trockengewicht + Trockengewicht der Aminosäuren aus der Suspensionsflüssigkeit (mg N aus der Zeile d $\times$ 6,25; MENKE 1938, CHIBNALL 1939) (f) und Eiweißabbau in Prozenten der ungefärbten Kontrolle (g).
Alle Werte in Milligramm bzw. Prozenten.

Eigenschaft der Suspension	1 Std gefärbt			24 Std gefärbt			Ungefärbt
	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N — AO-N	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N — AO-N	
<i>A. Bäckerhefe in Aq. dest. :</i>							
a) Gesamt-N, mg	3,595	0,189	3,406 = 100%	3,647	0,189	3,458 = 100%	3,028 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	1,800	0,048	1,752 = 51,5%	1,895	0,078	1,817 = 52,0%	2,406 = 79,4%
c) Alkoholauszug, mg N	1,363	0,112	1,251 = 36,7%	1,118	0,095	1,023 = 29,5%	0,562 = 18,6%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,432	0,029	0,403 = 11,8%	0,661	0,016	0,645 = 18,5%	0,060 = 2,0%
e) Trockengewicht, mg			51,1			49,5	52,0
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			53,6			53,5	52,4
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			35			35	
<i>B. Bäckerhefe in Leitungswasser:</i>							
a) Gesamt-N, mg	3,473	0,189	3,284 = 100%	3,357	0,189	3,168 = 100%	3,455 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,148	0,008	2,140 = 65,3%	2,185	0,068	2,117 = 66,7%	2,770 = 80,2%
c) Alkoholauszug, mg N	1,125	0,091	1,034 = 31,4%	0,930	0,107	0,823 = 26,1%	0,615 = 17,8%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,200	0,090	0,110 = 3,3%	0,242	0,014	0,228 = 7,2%	0,070 = 2,0%
e) Trockengewicht, mg			54,6			54,8	51,2
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			55,9			56,3	51,6
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			20			20	
<i>C. Bäckerhefe in Glucoselösung:</i>							
a) Gesamt-N, mg	3,737	0,189	3,548 = 100%	4,173	0,189	3,984 = 100%	3,477 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,568	0,026	2,542 = 71,5%	2,723	0,027	2,696 = 67,7%	2,931 = 84,2%
c) Alkoholauszug, mg N	0,934	0,073	0,861 = 24,4%	1,098	0,089	1,009 = 25,3%	0,463 = 13,4%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,235	0,090	0,145 = 4,1%	0,352	0,073	0,279 = 7,0%	0,083 = 2,4%
e) Trockengewicht, mg			58,5			65,3	94,8
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			59,4			67,0	95,3
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			15			20	

Schädigung oder Abtötung der Zelle einhergeht. Da aber in Leitungswasser nach 24stündiger Anfärbung 100% der Zellen rot fluorescieren, müssen 50—60% *reversibel rotfluorochromiert* sein; diese sind nur für die Dauer der Farbstoffeinwirkung als geschädigt zu betrachten. Die Schädigung wird beim Entzug des Farbstoffes wieder aufgehoben, und zwar nach einer gewissen Latenzzeit.

5. Die Beeinflussung des Stickstoffumsatzes.

BOGEN und KESER (1954) hatten nachgewiesen, daß in den Hefezellen bei AO-Gegenwart (in Aq.dest.) ein Eiweißabbau eintritt bzw. der Eiweißaufbau beim „turnover“ der Proteine verhindert wird. Es erschien notwendig, auch hier den Einfluß der Suspensionsflüssigkeit zu erfassen.

Zur Anwendung kam Bäckerhefe, 1:200 suspendiert in Aq.dest., Leitungswasser und Glucoselösung. Die gefärbten Suspensionen wurden jeweils nach 1 und 24 Std abzentrifugiert, die Kontrollen nur nach 24 Std, nachdem sich herausgestellt hatte, daß sich hier die Werte innerhalb der Versuchszeit nicht ändern. Ergebnisse in Tabelle 6.

Wie bei BOGEN und KESER wurde aller N als Eiweiß- bzw. Aminosäure-N bezeichnet, obgleich feststehen dürfte, daß ein Teil auch in anderer Bindung, z.B in Nucleinsäuren u. a., vorliegt. Indessen ist der Anteil dieser Stoffe gering; überdies handelt es sich hier nur um einen Vergleich mit den bereits bekannten Werten.

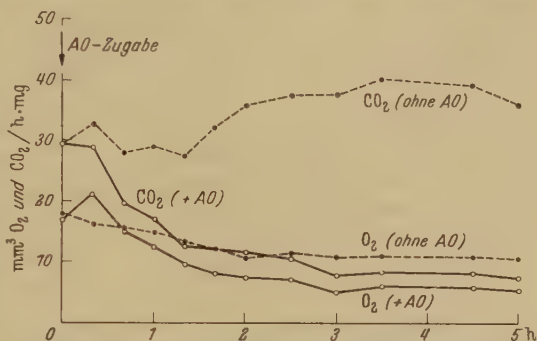
Der erste Versuch (Tabelle 6, A) mit Aq.dest. als Suspensionsflüssigkeit paßt sich gut in die von BOGEN und KESER festgestellten Werte mit den S.D. 1:50 und 1:500 ein. In Tabelle 7 sind die Prozentsätze aller 3 Suspensionsdichten einander gegenübergestellt. Zwar beziehen sich die Werte von BOGEN und KESER auf 12-, die hier vorgelegten auf 24stündige Versuchsdauer; da jedoch in Aq.dest. der Eiweißabbau nach 1 Std praktisch beendet ist, erscheint der Vergleich gerechtfertigt. In der letzten Horizontalreihe der Tabelle 7 ist der prozentuale Abbau im Verhältnis zum Resteiweiß der Kontrolle aufgeführt. Die Kontrollen gaben bei allen 3 Suspensionsdichten gleiche Werte.

Tabelle 7. *Eiweißabbau durch AO in Aq.dest. bei den S.D. 1:50, 1:200 und 1:500 nach 12 bzw. 24 Std.*

	1:50	1:200	1:500	Kontrollen
Eiweiß, % N	68,8	52,0	30,2	80,0
Alkoholauszug, % N	24,8	29,5	36,7	18—19
Suspensionsflüssigkeit, % N	2,8	18,5	33,1	1—2
Eiweißabbau durch AO, %	14	35	62,5	

Auch die Wirkung des AO auf den Eiweißabbau und die Permeabilitätsveränderung ist demnach abhängig von der Suspensionsdichte.

In Leitungswasser und Glucoselösung sind Proteinabbau und Permeabilitäts $\uparrow$ erhöhung *geringer* als in destilliertem Wasser. In beiden Fällen erreicht der Eiweißabbau nach 24 Std den gleichen Wert von 20%. Während aber in Leitungswasser der Abbau nach 1 Std bereits beendet ist, beginnt er in Glucoselösung mit 15% und steigt erst im weiteren Verlauf des Versuches auf 20% an.



6. Die Beeinflussung des Gaswechsels.

Die Beobachtung des Eiweißabbaus führte zu

der Frage, ob und in welcher Weise eine Beziehung zum Gaswechsel der Hefezellen besteht. Es war bereits festgestellt worden, daß eine Beeinflussung der Atmung durch Belüftung bzw. Azidzugabe eine Änderung der Farbstoffaufnahme und Anfärbung nach sich zieht; andererseits war es von Bedeutung, die Wirkung des Farbstoffes auf die Atmung zu prüfen.

a) Die Untersuchung wurde mit Hilfe der WARBURG-Methode durchgeführt. Bäckerhefe wurde in einer Lösung von 1% Glucose in Leitungswasser suspendiert (S.D. 1:200 und 1:500). Die Ausführung der Versuche ist im methodischen Teil beschrieben.

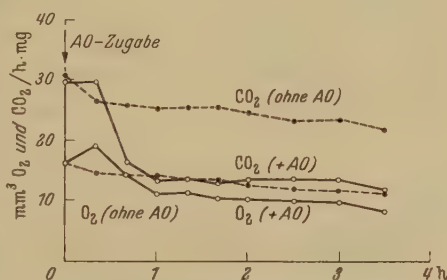


Abb. 19. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei Einwirkung von AO auf Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:500. Ordinate: mm³ O₂ bzw. CO₂/Std und 1 mg Hefe; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden nach AO-Zugabe.

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 und 19 graphisch dargestellt. Zur besseren Verdeutlichung wurden ferner auf Abb. 20 und 21 die unter dem Einfluß von AO gewonnenen Werte für die O₂-Aufnahme und die CO₂-Abgabe in *Prozenten der Kontrolle* aufgetragen.

Tabelle 8. *Quantitative Bestimmung*
Bäckerhefe in Glucoselösung, $\frac{1}{2}$, 2 und 5 Std mit AO angefärbt und ungefärbt;

Eigenschaft der Suspensionen	30 min gefärbt		
	Ge- samt-N	AO-N	Gesamt-N -AO-N
A. S. D. 1:200:			
a) Gesamt-N, mg	3,849	0,189	3,660 = 100 %
b) Eiweiß-N, mg	2,763	0,051	2,712 = 74,2 %
c) Alkoholauszug, mg N	0,886	0,066	0,820 = 22,4 %
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,200	0,072	0,128 = 3,4 %
e) Trockengewicht, mg			60,8
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			62,1
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			10,6
B. S. D. 1:500:			
a) Gesamt-N, mg	4,453	0,452	4,001 = 100 %
b) Eiweiß-N, mg	2,703	0,103	2,600 = 65,0 %
c) Alkoholauszug, mg N	1,273	0,112	1,161 = 29,0 %
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,477	0,237	0,240 = 6,0 %
e) Trockengewicht, mg			66,1
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			69,1
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			19,8

Abbau des Eiweißes das Primäre ist und eine Beeinträchtigung des Gaswechsels nach sich zieht.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden WARBURG- und KJELDAHL-Versuche mit Bäckerhefe, S. D. 1:200, unter den gleichen Bedingungen wie oben ausgeführt, wobei jedoch das AO durch das Atmungsgift Natriumazid (10^{-3} mol) ersetzt worden war.

Die Messungen des Gaswechsels sind in Abb. 23 dargestellt: Die Sauerstoffaufnahme ist sofort nach Azidzugabe *vollständig gehemmt*. Dagegen erfährt die Kohlendioxydabgabe eine kurzfristige Steigerung gegenüber der Kontrolle; nach 1 Std sinken die Werte dann unter die der Kontrolle.

Der Eiweißstoffwechsel bleibt innerhalb von 2 Std *unbeeinflusst*. Es findet keinerlei Abbau statt. Der intakte N-Umsatz bei völlig sistierter Atmung erlaubt den Schluß, daß bei der AO-Wirkung der *Eiweißabbau die primäre Reaktion* und die *Beeinflussung des Gaswechsels* erst die *Folge* des Eiweißabbaus ist. Dafür spricht auch, daß der Eiweißabbau bei der S. D. 1:500 nach 30 min fast *vollständig beendet* ist, während der Abfall der O_2 - bzw. CO_2 -Werte erst nach dieser Zeit *beginnt*. Bei der S. D. 1:200 ist diese Erscheinung nicht so augenfällig wegen des langsameren Abfallens der Kurven.

III. Besprechung der Ergebnisse.

Vorangestellt sei eine Übersicht über die wichtigsten Befunde, die sich aus dem Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen ergeben.

mungen des N-Stoffwechsels.

geschüttelt im Thermostaten bei 25°C. S.D. 1:200 und 1:500. Sonst wie Tabelle 6.

2 Std gefärbt			5 Std gefärbt			Ungefärbt
Ge-samt-N	AO-N	Gesamt-N -AO-N	Ge-samt-N	AO-N	Gesamt-N -AO-N	
4,157	0,189	3,968 = 100%	4,261	0,189	4,072 = 100%	3,961 = 100%
2,693	0,045	2,648 = 66,8%	2,370	0,035	2,335 = 57,3%	3,288 = 83,0%
1,243	0,081	1,162 = 29,3%	1,587	0,081	1,506 = 37,0%	0,574 = 14,5%
0,221	0,063	0,158 = 3,9%	0,304	0,073	0,231 = 5,7%	0,099 = 2,5%
	68,8			69,9		74,2
	70,2			71,8		74,8
	19,5			31,0		
4,316	0,452	3,864 = 100%	4,434	0,452	3,982 = 100%	3,417 = 100%
2,540	0,139	2,401 = 62,2%	2,375	0,174	2,201 = 55,3%	2,773 = 81,2%
1,293	0,124	1,169 = 30,3%	1,628	0,139	1,489 = 37,4%	0,546 = 16,0%
0,483	0,189	0,294 = 7,5%	0,431	0,139	0,292 = 7,3%	0,098 = 2,8%
	63,8			67,2		73,2
	66,8			70,0		73,8
	23,4			31,8		

A. Vergleich der Versuchsgruppen.

1. Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Bei *destilliertem Wasser* als Suspensionsmittel lassen sich für Bäckerhefe beide Prozesse wie folgt parallelisieren: Innerhalb eines „kritischen Bereiches“, nämlich der S.D. 1:50 bis 1:500, nimmt die Gesamtheit der Hefezellen *während 24 Std* jeweils die gleiche Farbstoffmenge auf (Abb. 11). Da bei der S.D. 1:500 weniger Zellen vorhanden sind als bei 1:50, steht jeder Zelle mehr Farbstoff zur Verfügung. Legt man die Auffassung zugrunde, daß Rotfluoreszenz höhere Farbstoffkonzentration am Adsorptionsort anzeigt, so muß bei geringer Suspensionsdichte der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher sein. Das ist aber genau das Ergebnis der Färbefunde. Analoges tritt bei Reinhefe auf.

Die Verhältnisse sind indessen wesentlich komplizierter, wenn man den *zeitlichen Ablauf* verfolgt: So ist z. B. bei Bäckerhefe innerhalb der ersten Stunde bereits 85% des gesamten (= 95 des innerhalb von 24 Std aufgenommenen) Farbstoffes aus der Suspensionsflüssigkeit verschwunden; in den folgenden 23,5 Std nehmen die Zellen nur noch weitere 5% Farbstoff auf (Abb. 13). Der Prozentsatz der roten Zellen steigt aber im gleichen Zeitraum um *mehr als das Anderthalbfache* an (Abb. 3). Der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen kann daher nicht als Maßstab für die Farbstoffaufnahme dienen.

Vergleicht man daraufhin Bäckerhefe und Reinhefe, beide in Aq. dest., so wird das Fehlen einer strengen Proportionalität noch deutlicher:

Bei Reinhefe ist der Prozentsatz rotfluoreszierender Zellen höher (Abb. 10), die Farbstoffaufnahme aber ganz erheblich geringer als bei Bäckerhefe.

In den Leitungswasserversuchen wird die Parallelität ebenfalls vermist; es erübrigt sich, die Belege noch einmal aufzuführen.

Bereits aus den Versuchen in Leitungswasser und Aq. dest., wo mit einem nennenswerten Stoffumsatz nicht zu rechnen ist, kann also geschlossen werden, daß es *nicht möglich ist, allein aus der Anfärbung auf die aufgenommene Farbstoffmenge zu schließen. Ebenso wenig läßt sich aus der Farbstoffmenge das Färberesultat voraussagen.*

Wenn man daher untersuchen will, inwieweit der AO-Effekt durch den physiologischen Zustand verändert wird, darf man die Diskussion allenfalls an Hand der Farbstoffaufnahme führen, nicht des optischen Färbefundes.

Zur Bekräftigung sei auf die in Glucoselösung stattfindende Entfärbung der grünfluorochromierten Zellen hingewiesen. Diese findet in den Farbstoffaufnahmekurven keinen Niederschlag. Ähnlich verhält es sich mit der Entfärbung eines *Teiles* der rotfluorochromierten Zellen: es gibt wenigstens 2 Formen der Rotfluoreszenz, von denen die eine bei Glucosezusatz reversibel ist, die andere nicht. Charakteristischerweise wird unter definierten Bedingungen stets der gleiche Prozentsatz der Zellen entfärbt.

Glucosezusatz regt den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefezellen an. Die bei der Gärung stattfindende Ansäuerung vermag die verringerte AO-Aufnahme zu erklären (s. S. 346). Bei Belüftung wird eine Atmung induziert: die Gärung nimmt entsprechend ab, die Wasserstoffionenproduktion ist geringer und folglich der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher. Dieser Effekt ist jedoch von der mechanischen Beschleunigung der Farbstoffzufuhr durch Verhinderung der Sedimentation überlagert, wie die ebenfalls stark erhöhte Rotfluorochromierung bei Durchlüftung in Leitungswasser zeigt (Abb. 6).

Bei Azidzusatz wird die Atmung verhindert, die CO_2 -Produktion kann sogar vorübergehend gesteigert sein. Die Ansäuerung im Zellinnern ist vermutlich noch stärker als in reiner Glucoselösung, und daraus folgt eine Verzögerung der Farbstoffaufnahme (Abb. 8).

Jedoch lassen sich nicht alle Versuchsergebnisse einfach aus der p_H -Änderung in der Zelle allein erklären. In belüfteter Glucoselösung ist der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen um so höher, je später AO der Versuchslösung zugesetzt wird (Abb. 6). Da die Farbstoffaufnahme nicht nur osmotischen Gesetzmäßigkeiten folgt, wird angenommen, daß die nichtosmotischen Prozesse bei erhöhtem Energiestoffwechsel ebenfalls beschleunigt sind und eine stärkere Farbstoffaufnahme bewirken. Anders verhält es sich mit dem reversiblen Auftreten grüner

Zellen mit gelbroten Einschlüssen in durchlüfteter Glucoselösung. Hier besteht die Möglichkeit, daß im Laufe der Stoffwechselvorgänge in der Zelle neue Adsorptionssorte für den Farbstoff gebildet werden, die später wieder verschwinden (s. S. 369).

Ähnliches kann für die gesteigerte Farbstoffaufnahme der Bäckerhefe in Schopfer-Lösung angenommen werden. In N-haltiger Nährlösung werden das Wachstum und das turnover in Gang gesetzt und somit die Zahl der Adsorptionssorte für das AO vermehrt. Die geringe Farbstoffaufnahme der Reinhefe widerspricht dieser Erklärung; sie kann jedoch durch eine geringere Permeabilität der Zellen verursacht sein. Diese Frage ist nicht zu entscheiden, da die Bestimmungen des Proteinabbaus in Nährlösung noch ausstehen. Diese lagen jedoch außerhalb des Rahmens dieser Arbeit, da sie markierte N-Verbindungen erfordert haben würden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine ganze Reihe physikalischer Faktoren, wie z. B. Farbstoffangebot, p_H -Änderungen, Permeabilität u. a., die Farbstoffaufnahme bestimmen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht allein auf diese Faktoren zurückzuführen, sondern zeigen an, daß die Anfärbung im wesentlichen von Bedingungen beeinflußt wird, die sich durch den Stoffwechsel der Zellen ergeben, also vom physiologischen Zustand der Zellen abhängen.

2. Das Wachstum.

BOGEN (1953) konnte nachweisen, daß AO das Wachstum der Hefezellen hemmt, daß die Hemmung dem Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen *nicht* proportional ist und daß auch grüne Zellen geschädigt sein können.

Aus den hier vorgetragenen Versuchen ergibt sich weiterhin:

a) AO ruft in jedem Falle eine vollständige oder teilweise Hemmung des Wachstums der behandelten Hefezellen hervor.

b) Nach der Übertragung AO-behandelter Zellen in AO-freies flüssiges oder auf festes Nährmedium wird diese Hemmung teilweise oder vollständig wieder aufgehoben oder sogar durch verstärktes Wachstum überkompensiert.

α) Das erneute Wachstum ist abhängig von der *Suspensionsdichte*: Mit der Verringerung der S.D. nimmt der Zuwachs in Nährlösung sowie auch die Zahl der auf Agar gebildeten Kolonien ab (s. S. 354).

Hierin stimmen Wachstums-, Anfärbe- und Farbstoffaufnahmeversuche überein.

β) Unterschreitet die Suspensionsdichte einen bestimmten Wert, so ist der (geringe) Zuwachs, unabhängig von der weiteren Verdünnung der Suspension, stets der *gleiche*; ein Verhalten, das als Selektion zu deuten ist (S. 349).

γ) Das Wachstum ist ferner abhängig von der verwendeten Hefeart. Zwischen Bäckerhefe und daraus isolierter Reinhefe fanden sich Unterschiede sowohl in der Anfärbung als auch in der Wirkung des AO auf das Wachstum. Diese Unterschiede sind nicht zu parallelisieren; über ihre Ursachen können vorerst noch keine Aufschlüsse gegeben werden.

δ) Schließlich ist das Wachstum abhängig von der Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit. Dabei entspricht wiederum die Zahl der auf Nähragar gebildeten Kolonien dem Prozentsatz der nicht bzw. reversibel rot gefärbten Zellen (s. S. 356).

In Glucoselösung vorgefärbte Zellen unterscheiden sich nicht von solchen aus Leitungswasser. Diese Übereinstimmung findet ihre Erklärung in der Entfärbung der in Leitungswasser reversibel rot gefärbten Zellen nach Übertragung in (glucosehaltige) Nährlösung. Zu den bereits genannten Wirkungen des Glucosezusatzes (Verzögerung der Farbstoffaufnahme, Verzögerung und Verhinderung 100%iger Rotfluorochromierung, Entfärbung der reversibel rotfluorochromierten Zellen und Entfärbung der grünen Zellen) tritt damit noch die partielle Aufhebung der durch AO gesetzten Wachstumshemmung. Vorbehandlung in verschiedenen N-haltigen Lösungen (mit AO-Zusatz) zeigt, daß der Farbstoffzusatz das erneute Wachstum um so stärker hemmt, je intensiver das Wachstum — und damit der N-Umsatz — der ungefärbten Zellen ist (s. S. 351). Reinhefe in vollständiger Nährlösung verhält sich insofern abweichend, als eine *Adaptation* der Hefe an den Farbstoff stattfindet. Diese steht im Zusammenhang mit der äußerst geringen Farbstoffaufnahme bzw. Anfärbung und möglicherweise auch mit dem Auftreten von Oberflächenhefen. Wichtig ist ferner die Tatsache, daß selbst diese geringe Farbstoffaufnahme zu einer vollständigen Sistierung des Wachstums über 24 Std führt (s. S. 348).

3. Der Proteinstoffwechsel.

In Aq. dest. zeigt der Proteinabbau die gleiche Abhängigkeit von der Suspensionsdichte, wie das Wachstum, die Farbstoffaufnahme und die Anfärbung: je geringer die Suspensionsdichte, desto stärker die Schädigung durch AO (s. S. 358).

Diese Abhängigkeit verschwindet, sobald Leitungswasser oder Glucoselösung als Suspensionsmittel verwendet werden. In beiden Fällen ist der Proteinabbau *gleich groß*, aber im Vergleich zum destillierten Wasser *geringer*. Der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen ist in Leitungswasser 100, also höher als in Aq. dest., in Glucoselösung 40, d. h. geringer als in destilliertem Wasser. Rotfluoreszenz und Proteinabbau sind mithin voneinander weitgehend *unabhängig*. Ebenso wenig ist eine Parallelität zur Farbstoffaufnahme gegeben: Aus Leitungs-

wasser und destilliertem Wasser nehmen die Zellen innerhalb von 24 Std die gleiche Menge AO auf; der Proteinabbau ist jedoch in Leitungswasser geringer. Demgegenüber zeigen Proteinabbau und Wachstum untereinander die *gleichen* Abhängigkeitsbeziehungen; Proteinabbau und Wachstumshemmung sind eng korreliert.

4. Der Gaswechsel.

Die Beeinflussung des Gaswechsels durch AO läßt keine Beziehungen zur Suspensionsdichte erkennen. Da jedoch beim WARBURG-Versuch bereits die AO-freien Kontrollen der S.D. 1:200 und 1:500 nicht unter gleichen Bedingungen gehalten werden können, darf aus dem negativen Befund nicht auf das Fehlen einer Proportionalität zur Suspensionsdichte geschlossen werden. Andererseits verläuft die Hemmung des Gaswechsels parallel dem Proteinabbau (vgl. hierzu S. 361).

Aus den einzelnen Punkten lassen sich folgende Feststellungen treffen:

In destilliertem Wasser und zum Teil noch in Leitungswasser besteht eine gute Proportionalität zwischen Anfärbung, Farbstoffaufnahme, Wachstumshemmung und Proteinabbau einerseits und der Suspensionsdichte andererseits. Dieser rein physikalische Faktor, dem einfach das bei geringer Suspensionsdichte erhöhte Farbstoffangebot zugrunde liegt, ist jedoch keineswegs das einzige Moment, das über das Ausmaß der AO-Effekte entscheidet: Sobald die Zugabe von Nährstoffen in die Suspensionsflüssigkeit die Intensität des Stoffwechsels erhöht, wird die Proportionalität vollständig überdeckt oder sogar aufgehoben. Statt dessen sind Qualität und Quantität dieser Stoffwechselvorgänge maßgebend. Dies aber nicht in dem Sinne, daß allein die Menge gewisser Stoffwechselprodukte (z. B. H-Ionen) die physikalischen Faktoren modifiziert. Vielmehr ist es die Veränderung des „physiologischen Zustandes“, der die in den Versuchen gemessenen Phänomene folgen. Dabei wird nunmehr ein enger Zusammenhang zwischen Proteinabbau, Wachstumshemmung und Gaswechselhemmung sichtbar.

B. Vergleich mit den Ergebnissen aus der Literatur.

Wenn diese Fragen nunmehr an Hand der Befunde aus der Literatur besprochen werden sollen, wird es vielfach erforderlich sein, auf die Vorgänge *in der einzelnen Zelle* einzugehen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die hier gemachten Aussagen lediglich statistischer Natur sind, d.h. das Verhalten eines Kollektivs von Zellen betreffen und daher nicht ohne weiteres auf die Einzelzelle bezogen werden können. So besagt z. B. der bei der S.D. 1:500 beobachtete Eiweißabbau weder, daß 63% der Zellen ihr *gesamtes* Eiweiß abgebaut haben, noch daß in *jeder* Zelle 63% ihres Eiweißes verschwunden sind. Gerade hier dürften *intermediäre* Abbaugrade vorliegen (BOGEN und KESER 1954). Dafür spricht unter

anderem, daß die Abbauprozente weder mit dem Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen noch mit dem Prozentsatz der abgetöteten Zellen (Plattenversuche) übereinstimmen. Hier, wie in zahlreichen anderen Fällen, wirken auch physiologische Differenzen *innerhalb der Population* entscheidend mit, wie etwa der Entwicklungszustand zum Zeitpunkt der Anfärbung (unterschiedliches physiologisches Alter).

1. Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Für die Aufnahme des basischen Farbstoffes AO in das Plasma der lebenden Zelle sind, nach der Theorie der Vitalfärbung (z. B. DRAWERT 1948), folgende physikalische Faktoren maßgebend:

1. Das Farbstoffangebot, das sowohl von der Gesamtmenge des Farbstoffes als auch von dem p_H -abhängigen Verhältnis zwischen seinen Ionen und Molekeln abhängt.

2. Das Farbstoffbindungsvermögen (Speicherungsvermögen) der Plasmabestandteile für Farbionen und undissoziierte Molekeln.

3. Die Permeabilität; diese modifiziert jedoch lediglich den zeitlichen Ablauf der Aufnahme; das Ausmaß bestimmt sie nur dann, wenn sie den Konzentrationsausgleich verhindert.

Die generelle Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme und der Anfärbung von der Suspensionsdichte kann mit dem Faktor „Farbstoffangebot je Zelle“ befriedigend erklärt werden. Sobald jedoch die p_H -Abhängigkeit betrachtet wird, reicht diese Erklärung nicht mehr aus; auch bei Einhaltung des für die AO-Färbung „optimalen“ p_H -Bereiches (p_H 5—7; STRUGGER 1940, 1949; KÖLBEL 1947) wurden erhebliche Unterschiede gefunden. Das ist andererseits verständlich, wenn man berücksichtigt, daß durch die Pufferung des Farbbades lediglich der p_H -Wert der Suspensionsflüssigkeit, nicht aber der des Zellinneren verändert wird. Nach FARRER (1953) ist die Pufferungskapazität von Hefezellen so groß, daß es nur unter extremen, bereits schädigenden Bedingungen möglich ist, die Wasserstoffionenkonzentration in der Zelle von außen her zu beeinflussen.

Mithin dürften die p_H -Änderungen *innerhalb der Zelle* von ausschlaggebender Bedeutung sein. Nach CONWAY und DOWNEY (1950) liegt der „durchschnittliche“ p_H -Wert ruhender Hefezellen bei 5,8. Bei *Glucose-fermentation* sinkt er in der äußeren Zone der Zelle auf 4,2 ab, während er im Zellinneren auf 6,35 ansteigt, und in der Suspensionsflüssigkeit wurden (in den vorliegenden Versuchen) Werte von p_H 4 und darunter gemessen. Es stellt sich also ein nach innen gerichtetes Wasserstoffionengefälle ein; der Farbstoff bewegt sich ihm entgegengesetzt. Damit ist eine physikalische Basis für die Entfärbung grün- bzw. rotfluorochromierter Zellen nach Glucosezugabe gewonnen.

Die Ansäuerung bei Glucoseveratmung beeinflußt aber auch den zweiten Faktor der Farbstoffaufnahme, das Farbstoffbindungsvermögen der Plasmabestandteile: Nach MASSART und Mitarbeitern (1947) treten die H-Ionen mit dem AO in Konkurrenz um die Bindungsorte und vermögen, wenn sie in großer Zahl vorhanden sind, sogar bereits gebundenes AO wieder zu verdrängen. Das muß sich gleichfalls in einer Entfärbung äußern.

Diese Erklärungen versagen indessen, wenn die Vorgänge bei Zugabe von Schopfer-Lösung in Rede stehen, denn hier ist der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen trotz Glucoseveratmung höher als in reiner Glucoselösung. Zieht man ferner in Betracht, daß Bäckerhefe und Reihhefe bei gleichen p_H -Bereichen verschiedenes Anfärbeverhalten zeigen, so wird deutlich, daß der Ablauf der Stoffwechselprozesse nicht allein die quantitativen Voraussetzungen für das Farbstoffbindevermögen schafft, sondern auch die „speichernden Phasen“ qualitativ verändert.

Als solche müssen aber vor allem die Nucleinsäuren der Zelle gelten (z. B. GÖSSNER 1950; ZEIGER, HARDERS und MÜLLER 1951; BETZ 1953 für AO; WAGNER-JAUREGG 1943; STICH 1951 u. a. für andere Acridinderivate; weitere Literatur vgl. BOGEN 1953, BOGEN und KESER 1954). Angesichts der überragenden Rolle, die die Nucleinsäuren bei der Entwicklung und beim Stoffwechsel, besonders beim Proteinstoffwechsel, der Zelle spielen (z. B. CASPERSSON 1950), ist es ohne weiteres einleuchtend, daß für die Plasmafärbung Menge und (physiologischer) Zustand der Nucleinsäuren von größerer Wichtigkeit sind, als die oben angeführten Faktoren, die lediglich *Voraussetzungen* für die Anfärbung sind. Diese Auffassung wird in vielen wesentlichen Punkten gestützt durch die hier vorgelegten experimentellen Befunde; es sei nur erinnert an die Proportionalität zwischen Wachstumshemmung und Stoffwechselintensität (S. 367), an die qualitativen Färbedifferenzen insbesondere bei der reversiblen und irreversiblen Rotfluoreszenz u. a. m. Andererseits ist es bei der noch durchaus ungenügenden Kenntnis des Nucleinsäureumsatzes in der Zelle nicht befremdlich, daß eine Kongruenz von Farbstoffbindung und Nucleinsäureumsatz vorerst nicht quantitativ erfaßbar ist.

Die Befunde über Auftreten und Verschwinden der rot-gelb gefärbten Einschlüsse können danach nur mit großer Vorsicht interpretiert werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich hierbei um Mitochondrien handelt, wie sie LINDEGREN (1951) für Hefe beschrieben hat und wie sie durch AO gefärbt werden können (BORCHERT und HELMCKE 1950; STOCKINGER 1952 u. a.). Wie BAUTZ und MARQUARDT (1953a und b) und MARQUARDT und BAUTZ (1954) zeigten, steigt deren Zahl bei Belüftung untergäriger Hefe und sinkt bei Azidzusatz zu atmender Hefe. Ein analoges Verhalten von Hefezellen mit gefärbten Einschußkörpern wurde auf

S. 337 beschrieben, doch reichen die Tatsachen ohne eingehende cytologische Analyse nicht aus, um eine Identifizierung zu sichern. Weitere, hier nicht aufgeführte, experimentelle Befunde sprechen dafür, daß die Einschußkörper nur einen Teil der Mitochondrien sowie einen Teil der Mikrosomen ausmachen.

Immerhin kann die Tatsache, daß Belüftung die Anfärbung beschleunigt und Azid sie verzögert, nicht nur als direkte Einflußnahme des Energiestoffwechsels auf die Farbstoffaufnahme, sondern auch als Schaffung bzw. Beseitigung farbstoffadsorbierender Zentren gedeutet werden.

2. Das Wachstum.

Eine Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen durch AO und andere Acridinderivate ist eine geläufige Erscheinung, die bereits vielfach beschrieben worden ist. Sie kann so stark ausgeprägt sein, daß vollständige Inaktivierung und Abtötung eintritt (z. B. für Bakterien: DEAN und HINSHELWOOD 1951; FLEGEL 1953; STEIN 1953; für Paramaecien: BORCHERT und HELMCKE 1951; für Hefe: BOGEN 1953; weitere Literatur bei BOGEN und KESER 1954). Der Wirkungsmechanismus konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Da in letzter Zeit bekannt wurde, daß das AO nachdrücklich in den Proteinumsatz eingreift, soll diese Frage in Abschnitt 3 und 4 behandelt werden.

a) **Selektion.** Wie aus den auf S. 349 angeführten Versuchen hervorgeht, gibt es auch bei Reinhefe in jeder Suspension einige Zellen, die dem Zugriff des AO entzogen sind; sie überleben und werden unter Umständen sogar zu einem beschleunigten Wachstum veranlaßt. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um mutierte Zellen handelt. Indessen zeigte MARCOVICH (1953), daß das AO (im Gegensatz zum Euflavin: EPHRUSI 1951) wohl toxisch, nicht aber mutagen wirkt. Proflavin, das bei *Bact. lactis aerogenes* ganz ähnliche Effekte zeitigt wie AO an Hefe (DEAN und HINSHELWOOD 1951), ist ebenfalls nicht mutagen; DEAN und HINSHELWOOD sprechen hier von einer Resistenz (-entwicklung), die in einem „training“ der Zellen an den Farbstoff bestehe. (Dieses „training“ ist vermutlich nicht adaptativer Natur.) Es erscheint daher berechtigt, das Überleben einiger Hefezellen in den oben angeführten Versuchen auf Selektion zurückzuführen.

b) **Adaptation.** Die auf S. 350 beschriebene Adaptation hat ihr Gegenstück in der Adaptation von *Bact. lactis aerogenes* an *Proflavin*, die BASKETT (1951) in Fortführung der Versuche von DEAN und HINSHELWOOD nachwies, wie auch in der Adaptation eines *Coli*-Phagen an 3,5-Diamino-10-methylacridin (MUTSAARS 1950). Das Auftreten adaptierter Zellen ist dabei von der Stoffwechselaktivität abhängig.

Es erscheint nicht angängig, diese Adaptation an AO zu parallelisieren mit der Adaptation von Hefezellen an Sauerstoff oder an Nähr-

substrate, wie z. B. Galaktose u. a. (SPIEGELMAN 1951). In diesen Fällen bewirkt der „inducer“ eine Umstellung des Stoffwechsels in dem Sinne, daß die Zelle nunmehr den „inducer“ selbst *verwerten* kann. Beim AO hingegen werden die adaptierten Zellen befähigt, *trotz* des Stoffwechselgiftes zu wachsen, es entweder unschädlich zu machen oder zu ertragen oder aus den Zellen zu entfernen. Das heißt, sie müssen entweder einen „Entgiftungsmechanismus“ aufbauen, oder sie müssen ihren gesamten Stoffwechsel so umstellen, daß er nunmehr die durch AO blockierten Stellen vollständig und glatt umgeht — für beide Ansichten lassen sich einstweilen keine Anhaltspunkte finden. Wahrscheinlicher ist es daher, daß die adaptierten Zellen eine Möglichkeit entwickelt haben, den Farbstoff wieder auszuschcheiden (bzw. die höheren AO-Mengen im DELBRÜCK-LURIA-Test gar nicht erst aufzunehmen). An sich kann offenbar jede Hefezelle eine gewisse Menge AO wieder abgeben, wenn sie einen ausgiebigen Kohlenhydrat- und N-Stoffwechsel hat (s. S. 369); das zeigen die Versuche über die Entfärbung von Zellen nach Glucosezusatz und die Einstellung eines „Gleichgewichtes“ von 40% roten und 60% grünen bzw. entfärbten Zellen. Die adaptierten Zellen dürften diesen gegenüber befähigt sein, auch größere Farbstoffmengen auszuschcheiden.

3. und 4. *Proteinstoffwechsel und Gaswechsel.*

Bereits BOGEN und KESER (1954) wiesen darauf hin, daß die Vielzahl der AO-Effekte auf einen zentralen Angriffspunkt des Zellgiftes schließen lassen, von dem diese Effekte als sekundär abzuleiten sind, und sie gaben Hinweise für die Hypothese, daß der Farbstoff das Protein-turnover auf der Syntheseseite blockiere (dort auch weitere Literatur). Die hier vorgelegten Befunde stimmen mit den Ergebnissen von BOGEN und KESER vollständig überein und erweitern sie im Hinblick auf die oben angeführte Hypothese. Dabei dürfte von besonderer Wichtigkeit sein, daß sich weder die Proteinstoffwechsel- noch die Gaswechselhemmung mit den Färbeergebnissen parallelisieren läßt, und daß statt dessen eine Übereinstimmung mit den Wachstumsbefunden sichtbar wird. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, daß die Hemmung des Proteinstoffwechsels und des Gaswechsels nach gleichsinnigen Kurven verläuft: In der S.D. 1:500 maximale Herabsetzung innerhalb der ersten Stunde, in 1:200 allmählicher Abfall während 5 Std. Eine kleine, aber bemerkenswerte Differenz findet sich, wenigstens bei 1:500, insofern, als die Kurve der Gaswechselhemmung gegenüber der Kurve des Eiweißabbaues zeitlich ein wenig verschoben ist: sie liegt „später“ (Abb. 21 und 22). Offensichtlich ist die Hemmung der Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe erst die *Folge* des Proteinabbaus, von dem auch die (Proteine der) Atmungsenzyme betroffen werden.

Diese Auffassung wird bekräftigt durch die Befunde, die EPHRUSSI und Mitarbeiter (1953) und POLLOCK (1953) über die Adaptationserschei-

nungen bei Hefe erhoben haben: Nach EPHRUSSI und SLONIMSKI (1950) steigt der Cytochromgehalt von Hefekulturen nach Sauerstoffzufuhr innerhalb von 3 Std um 50% gegenüber der unbelüfteten Kontrolle. Acriflavin hingegen hemmt — im Verlaufe dieser Adaptation an den Sauerstoff — spezifisch die *Bildung der Cytochromoxydase* (SLONIMSKI 1953). Dies ist der einzige Angriffspunkt des Acriflavins. Andere („toxische“) Acridine verhindern daneben auch noch die Enzyymbildung bei maltose- oder galaktoseadaptierenden Hefen. Es liegt nahe, dem AO eine noch breitere Angriffsbasis zuzuschreiben, vor allem, weil das Ausmaß des Proteinabbaus so überraschend hoch ist. Überdies rechnet MARCOVICH (1953) das AO zu den toxischen Acridinen.

SLONIMSKI nimmt an, daß die Enzymsynthese durch spezifische Oberflächen cytoplasmatischer Partikel (Mitochondrien) katalysiert wird, und daß das Acriflavin mit den Reaktionspartnern bzw. Enzymvorstufen um die spezifischen Oberflächen konkurriert. POLLOCK (1953) hat diese Vorstellung durch Einführung der sog. SR-Cyclen (self-reproducing cycles) erweitert. Diese SR-Cyclen, die ähnlich dem Tricarbonsäurecyclus funktionieren und zum Teil eine partikuläre Grundlage haben können, produzieren einen Faktor, der zusammen mit einem spezifischen Kernstoff („organizer“) die Vorstufe des adaptativen Enzyms bildet. Sauerstoff oder Galaktose oder Maltose als „inducers“ lassen dann aus dieser Vorstufe das entsprechende spezifische Enzym entstehen. Die Acridine aber *greifen in diese SR-Cyclen ein* und verhindern so die Ausbildung der Enzyme. Damit ist eine völlige Übereinstimmung mit der Auffassung von BOGEN und KESER hergestellt: Das AO verhindert in der Tat die Synthese von Enzymen und zwar augenscheinlich nicht nur von adaptativen, sondern auch von konstitutiven Enzymen und anderen Proteinen, wenn diese nach Maßgabe des turnovers gleichfalls über SR-Cyclen hergestellt werden. Gegenüber den „spezifisch“ wirkenden Acridinen, wie Acriflavin, die nur eine oder wenige Enzymsynthesen hemmen (Cytochromoxydase bzw. Malto- oder Galaktotzymase), greift das AO in das turnover einer Reihe weiterer Proteinfractionen ein. Dies erklärt, wieso seine Effekte in so großer Zahl und an so verschiedenen Stellen des Zellgeschehens sichtbar werden. (So sind z. B. die Hemmung des Gaswechsels und die Wachstumshemmung die Folge des Proteinabbaus; daher sind alle 3 Phänomene in ihren experimentell erfaßten Abhängigkeitsbeziehungen parallelisiert.)

Es steht daher zu erwarten, daß die konsequente Anwendung des AO weitere Einblicke in die Mechanismen der Proteinsynthese, der SR-Cyclen usw. ermöglichen wird.

Zusammenfassung.

An Bäckerhefe und einer daraus isolierten Reinhefe wird 1. die Anfärbung mit Acridinorange (AO) fluorescenzmikroskopisch kontrolliert,

2. die Farbstoffaufnahme photometrisch bestimmt, sowie der Einfluß des Farbstoffes auf 3. Wachstum (Zellzählung und Plattenkulturen), 4. Proteinumsatz (Mikro-Kjeldahl-Methode) und 5. Gaswechsel (manometrisch nach WARBURG) untersucht. Dabei wird der physiologische Zustand der Hefezellen durch verschieden zusammengesetzte Suspensionsflüssigkeiten (Aq. dest., Leitungswasser, 1%ige Glucoselösung, Nährlösung nach SCHOPFER) verändert und geprüft, inwieweit die oben angeführten Phänomene diesen Änderungen folgen.

1. Anfärbung. In Aq. dest. und Leitungswasser, wo der Stoffwechsel der Zellen nur gering ist, erweist sich der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen als abhängig von der Suspensionsdichte und von der Dauer der Farbstoffeinwirkung.

Diese Proportionalität wird meist völlig überdeckt, sobald durch Zusatz von Glucose oder den Komponenten der Schopfer-Lösung zum Suspensionsmittel der Stoffwechsel aktiviert wird: Die Rotfluoreszenz ist (bei Bäckerhefe) verzögert, die Zahl der Zellen mit gelbroten Einschlüssen herabgesetzt, die grünen Zellen und ein Teil der rotfluorochromierten Zellen werden *entfärbt*, und schließlich stellt sich ein Gleichgewicht zwischen roten und grünen bzw. entfärbten Zellen ein, das seinerseits von der Suspensionsdichte abhängt. Belüftung und Schütteln der Suspension beschleunigen, Zusatz von Natriumazid verzögert die Rotfluorochromierung.

Zwischen Bäckerhefe und Reinhefe bestehen unter gleichen äußeren Bedingungen erhebliche Farbeunterschiede quantitativer und qualitativer Art. Da es überdies wenigstens zwei verschiedene Formen der Rotfluorochromierung gibt, von denen die eine reversibel, die andere irreversibel ist, wird geschlossen, daß die Anfärbung wesentlich vom physiologischen Zustand der Zellen bestimmt wird. Indessen besteht keine direkte Proportionalität zwischen Stoffwechselaktivität und Anfärbung.

2. Farbstoffaufnahme. Die Gesamtheit aller Zellen einer Suspension (in Aq. dest.) nimmt bei allen Suspensionsdichten nach 24 Std die gleiche Menge Farbstoff auf. Belüftung beschleunigt, Azidzusatz verzögert die Farbstoffaufnahme. Bäckerhefe verhält sich anders als Reinhefe, ebenso führt ein Wechsel des Suspensionsmittels zu erheblichen Unterschieden.

Die Differenzen sind von der Wasserstoffionenkonzentration in der Suspensionsflüssigkeit weitgehend unabhängig; sie können hingegen in manchen Fällen erklärt werden mit der Ansäuerung, die *im Zellinnern* als Folge der Glucoseveratmung einsetzt. Daneben spielen jedoch qualitative Unterschiede in der Menge und im Farbstoffbindungsvermögen der (nucleinsäurehaltigen) Plasmabestandteile, die im Gefolge der Stoffwechselabläufe sich ausbilden, eine überragende Rolle. Davon dürften vor allem die Mitochondrien betroffen werden.

Demgemäß treten bei der Farbstoffaufnahme nur vereinzelt die gleichen Abhängigkeitsbeziehungen zutage, wie bei der Anfärbung; in der Mehrzahl der Fälle sind die beiden Prozesse nicht mehr zu parallelisieren.

3. Wachstum. AO hemmt das Wachstum von Bäckerhefe und Reinhefe in allen Fällen ganz oder teilweise. Diese Hemmung ist in verschiedenen Suspensionsmitteln, bei verschiedenen Stickstoffquellen und bei Bäckerhefe und Reinhefe verschieden. Sie hält am längsten an, wenn die unbehandelten Kontrollen besonders stark wachsen bzw. einen intensiven Eiweißumsatz haben.

Nach Unterschreitung einer bestimmten Suspensionsdichte wird Reinhefe in Aq. dest. abgetötet. Das Überleben einiger weniger Zellen wird als *Selektion* gedeutet.

Ferner kann Reinhefe durch AO-Behandlung in Nährlösung an den Farbstoff *adaptiert* werden (DELBRÜCK-LURIA-Test). Die adaptierten Zellen enthalten weniger Farbstoff; sie haben vermutlich die Fähigkeit gewonnen, den Farbstoff in größerer Menge wieder auszuschcheiden als die nicht adaptierten Zellen.

4. Proteinabbau. Der Proteinabbau ist ebenfalls von der Suspensionsdichte abhängig. In Glucoselösung und Leitungswasser ist er gleich groß, aber jeweils geringer als in Aq. dest. Dieses Ergebnis findet keinen Niederschlag in den Färbefunden, da in Leitungswasser der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher, in Glucoselösung aber geringer ist als in Aq. dest.

5. O₂-Aufnahme und CO₂-Produktion werden durch AO gleichlaufend mit dem Proteinumsatz gehemmt. Dabei ist aber die Gaswechselhemmung nicht die Ursache des Proteinabbaus, da Zugabe von Azid die O₂-Aufnahme ungefärbter Zellen augenblicklich sistiert, ohne indessen einen Proteinabbau hervorzurufen.

6. Wachstum, Proteinumsatz und Gaswechsel in AO-Gegenwart stimmen untereinander völlig überein, nicht aber oder nur selten mit der Anfärbung und der Farbstoffaufnahme. Da in einigen Fällen gezeigt werden kann, daß der Proteinabbau etwas früher einsetzt als die Gaswechselhemmung, wird vermutet, daß das AO primär den Proteinumsatz blockiert; Gaswechselhemmung und Wachstumshemmung sind dann *Folgeerscheinungen* des Proteinabbaus, von dem auch die (Proteine der) Atmungsenzyme betroffen sein dürften.

7. In der Diskussion wird auf die Wirkungsweise des Farbstoffes eingegangen. Es ergeben sich enge Beziehungen zu den Ergebnissen von EPHRUSSI und SLONIMSKI (Hemmung der Synthese adaptativer Enzyme, insbesondere der Cytochromoxydase, durch Acridine) und POLLOCK (Blockierung von „self-reproducing cycles“).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Untersuchungen.

Literatur.

- BASKETT, A. C.: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **139**, 251—262 (1951). —
 BAUTZ, E., u. H. MARQUARDT: Naturwiss. **40**, 531—532 (1953a); **40**, 532—533 (1953b). — BETZ, A.: Planta (Berl.) **41**, 323—357 (1953). — BOGEN, H. J.: Arch. Mikrobiol. **18**, 170—197 (1953). — BOGEN, H. J., u. M. KESER: Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 446—462 (1954). — BORCHERT, R., u. J. G. HELMCKE: Naturwiss. **37**, 565 (1950); **38**, 48 (1951). — BUKATSCH, F., u. M. HAITINGER: Protoplasma (Berl.) **34**, 515—523 (1940). — CASPERSSON, T. O.: Cell growth and cell function. New York 1950. — CHIBNALL, A. CH.: Protein metabolism in the plant. New Haven 1939. — CONWAY, E. J., and M. DOWNEY: Biochemic. J. **47**, 355—360 (1950). — DEAN, A. C. R., and C. HINSHELWOOD: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **139**, 236—250 (1951). — DIXON, M.: Manometric methods, 3. Aufl. Cambridge 1951. — DRAWERT, H.: Z. Naturforsch. **3b**, 111—120 (1948). — EPHRUSSI, B.: Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Their bearing in cell heredity and differentiation. Oxford 1953. — EPHRUSSI, B., and H. HOTTINGUER: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 75—85 (1951). — EPHRUSSI, B., et P. P. SLONIMSKI: C. r. Acad. Sci. Paris **230**, 685—686 (1950). — FALES, F. W.: J. of biol. Chem. **202**, 157—167 (1953). — FARRER, K. T. H.: Austral. J. exper. Biol. a. Med. Sci. **31**, 577—582 (1953). — FLEGEL, H.: Zbl. Bakter. I. **159**, 342—354 (1953). — GEBELEIN, H., u. H. J. HEITE: Statistische Urteilsbildung. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951. — GÖSSNER, W.: Verh. dtsch. Ges. Path. (33. Tagg. Kiel) **1950**, 102—109. — KLINGMÜLLER, V.: Z. analyt. Chem. **131**, 17—24 (1952). — KÖLBEL, H.: Z. Naturforsch. **2b**, 382—392 (1947). — LINDEGREN, C. C.: The yeast cell, its genetics and cytology. St. Louis 1949. — LOOFBOUROW, J. R.: Biochemic. J. **41**, 119—122 (1947). — LOOFBOUROW, J. R., S. OPPENHEIM-ERRERA, D. G. LOOFBOUROW and C. A. YEATS: Biochemic. J. **41**, 122—129 (1947). — MARCOVICH, H.: Ann. Inst. Pasteur **85**, 199—216 u. 443—450, (1953). — MARQUARDT, H., u. E. BAUTZ: Naturwiss. **41**, 361—362 (1954). — MASSART, L., G. PETERS, J. DE LEY and R. VERCAUTEREN: Experientia (Basel) **3**, 288—289 (1947). — MENKE, W.: Z. Bot. **32**, 273—295 (1938). — MUTSAARS, W.: Nature (Lond.) **165**, 397 (1950). — PIRSON, A., C. TICHY u. G. WILHELMI: Planta (Berl.) **40**, 199—253 (1952). — POLLOCK, M. R.: 3. Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge 1953, 150—177. — SLONIMSKI, P. P.: 3. Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge 1953, 76—94. — SPIEGELMAN, S.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 87 (1951). — STEIN, W.: Naturwiss. **40**, 26 (1953). — STICH, H.: Naturwiss. **38**, 435 (1951). — STOCKINGER, L.: Z. mikroskop.-anat. Forsch. **59**, 304—325 (1952). — STRUGGER, S.: Jena. Z. Naturwiss. **73**, 96—134 (1940). — Flora (Jena) **137**, 73—94 (1944). — Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949. — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. P. STAUFFER: Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis 1947. — WAGNER-JAUREGG, TH.: Naturwiss. **31**, 335 (1943). — WEBB, A. M., and J. R. LOOFBOUROW: Biochemic. J. **41**, 114—119 (1947). — ZEIGER, K., H. HARDERS u. W. MÜLLER: Protoplasma (Wien) **40**, 76—84 (1951).

Lebenslauf

Am 22. 1. 1927 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Walter Elste und seiner Ehefrau Käthe, geborene Schreiber, in Calbe an der Saale geboren.

Nach der Übersiedlung nach Essen an der Ruhr besuchte ich dort von 1933—1937 die Volksschule und anschließend die Helmholtz-Oberschule. Seit Februar 1943 war ich als Luftwaffenhelfer eingesetzt und wurde im Oktober 1944 mit dem Reifevermerk entlassen. Nach 2 Monaten Arbeitsdienst wurde ich im Dezember zur Wehrmacht eingezogen und im Juli 1945 aus englischer Kriegsgefangenschaft entlassen. Im Mai 1946 bestand ich nach dem Besuch eines Sonderlehrganges die Reifeprüfung. Anschließend verbrachte ich meine Lehrzeit bei Herrn Dr. REISSNER in der Stern-Apotheke in Essen und legte im März 1948 in Düsseldorf die pharmazeutische Vorprüfung ab. Im Wintersemester 1948/49 begann ich mein naturwissenschaftliches Studium an der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn mit den Fächern Pharmazie und Botanik. Im Oktober 1952 bestand ich dort die pharmazeutische Prüfung. Meine Dissertation fertigte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. J. BOGEN an. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit und bin evangelischer Konfession.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren bzw. Dozenten: ALVERDES, ASMUS, BOGEN, BÖHME, BÜSING, DIETZEL, JAGODZINSKI, MAHR, MEERWEIN, PIRSON, SCHMITT-HENNER, STEFFEN und WALCHER.

